



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

보건학 석사 학위 논문

유전자 특이성 기반
치주 질환 원인균 동정 및 분류

**Classification of Periodontal Pathogens
Based on Genetic Specificity**

2014년 8월

서울대학교 보건대학원
보건학과 바이오인포매틱스 전공

송 연 정

유전자 특이성 기반 치주 질환 원인균 동정 및 분류

지도교수 손 현 석

이 논문을 보건학 석사 학위논문으로 제출함

2014년 4월

서울대학교 보건대학원
보건학과 바이오인포매틱스 전공

송 연 정

송연정의 석사학위논문을 인준함

2014년 6월

위 원 장 정 해 원 (인)

부 위 원 장 조 성 일 (인)

위 원 손 현 석 (인)

국 문 초 록

치주 질환은 치아 지지조직에 발생하는 파괴적인 염증성 질환으로 구강 내 세균 및 산물이 조직 파괴의 주원인이다. 지금까지 밝혀진 구강 미생물은 약 600여 종으로 치주 질환자의 구강 내에서는 약 200여 종의 미생물이 검출되었다. 이 가운데 치주 질환 원인균으로 밝혀진 종들은 약 10여 종에 불과하며, 이들은 주로 혐기성, 그람 음성균에 속한다. 치주 질환 원인균에는 치주조직에 염증을 일으키는 병독성 인자들이 있는데, 이들은 치주조직을 파괴하는 인자들과 숙주의 면역작용을 억제하는 인자들로 구성된다. 세균의 형태학적 분류의 한계로 유전자 서열을 이용한 구강 미생물에 대한 분류의 중요성이 커지고 있는 가운데, 국내외에서 유전자 마커를 이용한 구강 미생물들의 분류에 관한 많은 연구가 수행되고 있다. 그러나 치주 질환을 일으키는 원인균의 유전자 서열 정보를 통합한 정보는 부족한 실정이므로 이번 연구에서는 일차적으로 구강 내에 존재하는 모든 구강 미생물들의 유전자 정보를 통합한 데이터베이스를 구축하고, 수집된 종들을 대상으로 병독성 인자들을 결정하는 유전적 유사성의 정도를 상호 비교 분석하여 잠재적 치주 질환 원인균을 새롭게 예측하고자 하였다. 완성된 데이터베이스는 PPVF라 명명하였고, 온라인에서 이용할 수 있도록 <http://lcbb.snu.ac.kr/ppvf/>에 공개하였다. 그 결과 잠재적인 치주 질환 원인균으로 추정할 수 있는 13종의 구강 미생물이 새롭게 제시될 수 있었다. 이들은 현재 치주 질환의 원인균으로 추정되는 종과, 건강한 사람들의 구강 내에서 검출되는 정상적인 구강 상주균으로 구성된다. 그들 자체의 병원성은 매우 낮지만 구강 내 정상 세균총의 균형이 깨어져 숙주의 면역체계에 이상이 생기면 병원성을 보이는 기회 감염균들로, 이때 나타나는

그들의 병독성은 강력하다고 알려져 있다. 본 연구의 결과는 그동안 치주 질환과의 연관성이 불확실하다고 간주되었던 종들에서 잠재적 치주 질환 원인균을 찾아 낼 수 있었다는 점에서 중요한 발견이라 사료되며 이는 향후 치주 질환에 대한 정확한 진단 및 인과관계 규명에 기초자료로 활용됨으로써 항생제 개발을 포함한 연구의 기반이 되어 치의학, 보건학 등 관련 학문의 발전에 기여할 수 있을 것이라 기대한다.

.....

주요어 : 치주 질환 , 치주 질환 원인균 , 보건학, 바이오인포매틱스
학 번 : 2012-21892

*For my family and professor for their right and
spiritual guidance.*

목 차

국문 초록	ii
목 차	v
표 목차	vii
그림 목차	viii

제 1 장. 서 론

1.1 치주 질환	3
1.1.1 치은염	3
1.1.2 치주염	5
1.2 치주 질환의 병인론	8
1.2.1 숙주요인	8
1.2.2 세균요인	12
(1) <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	14
(2) <i>Porphyromonas gingivalis</i>	15
(3) <i>Prevotella intermedia</i>	18
(4) <i>Tannerella forsythia</i>	19
(5) <i>Fusobacterium nucleatum</i>	21
1.3 구강 미생물의 계통수	25

1.4 연구의 필요성 -----	29
1.5 연구 목적 -----	31
제 2 장. 연구 방법	
2.1 데이터 수집 및 가공 -----	33
2.2 시스템 개발 환경 및 BLAST 서버 구축 -----	36
2.3 데이터베이스 구현 -----	38
2.4 데이터베이스 분석 항목 -----	41
2.5 계통수 작성과 정확도 측정 -----	44
제 3 장. 연구 결과	
3.1 마커 유전자 기반 검색 시스템 구축 -----	47
3.2 데이터베이스 기반 치주 질환 유발 추정군 탐색 -----	60
제 4 장. 고찰 및 결론	
4.1 활용방안 -----	83
4.2 보건학적 연구에 적용 -----	85
4.3 향후 보완 및 추가계획 -----	86
참고문헌 -----	88
Abstract -----	97

LIST of TABLES

Table 1.1 Scientific classification of <i>A. actinomycetemcomitans</i> and <i>Porphyromonas gingivalis</i> -----	23
Table 1.2 Virulence factors of <i>A. actinomycetemcomitans</i> -----	23
Table 1.3 Scientific classification of <i>Prevotella intermedia</i> ,... -----	24
Table 1.4 Phylogenetic distribution of 619 taxa in HOMD -----	28
Table 2.1 System development environment -----	37
Table 2.2 Schema of the database -----	40
Table 2.3 The species of periodontal pathogen and their virulence... -----	43
Table 3.1 Amount of sequence data -----	51
Table 3.2 Amount of sequence data for genetic marker -----	52
Table 3.3 Percent Identity Matrix of Periodontal pathogens -----	65
Table 3.4 Percent Identity Matrix of Capsular polysaccharide... -----	65
Table 3.5 Percent Identity Matrix of collagenase -----	66
Table 3.6 Percent Identity Matrix of RhAA1 gene -----	66
Table 3.7 Percent Identity Matrix of Cytolethal distending... -----	67
Table 3.8 Percent Identity Matrix of Kgp gene -----	67
Table 3.9 Percent Identity Matrix of RGP-2 gene for gingipain... -----	68
Table 3.10 Percent Identity Matrix of gppX gene -----	68
Table 3.11 Percent Identity Matrix of fipA gene -----	69
Table 3.12 Percent Identity Matrix of Hemagglutinin gene -----	69
Table 3.13 Percent Identity Matrix of Elastase precursor gene -----	70

LIST of FIGURES

Figure 2.1 Genbank data before processing -----	34
Figure 2.2 Genbank data after processing using Java script -----	35
Figure 3.1 Front page of the database -----	53
Figure 3.2 Search table of ORAL MICORBIAL menu -----	54
Figure 3.3 Search table of PATHOGEN MARKER menu -----	55
Figure 3.4 Standalone BLAST web interface -----	56
Figure 3.5 Result of species identification using BLAST -----	57
Figure 3.6 Pair-wise alignment web interface -----	58
Figure 3.7 Result of pair-wise alignment -----	59
Figure 3.8 Phylogenetic tree(ML) based on periodontal pathogens ---	71
Figure 3.9 Phylogenetic tree(ML) based on Capsular polysaccharide.	71
Figure 3.10 Phylogenetic tree(ML) based on Collagenase gene -----	72
Figure 3.11 Phylogenetic tree(ML) based on RhAA1 gene -----	72
Figure 3.12 Phylogenetic tree(ML) based on Cytolethal distending toxin gene -----	73
Figure 3.13 Phylogenetic tree(ML) based on Kgp gene -----	73
Figure 3.14 Phylogenetic tree(ML) based on RGP-2 gene for... -----	74
Figure 3.15 Phylogenetic tree(ML) based on gppX gene -----	74
Figure 3.16 Phylogenetic tree(ML) based on fipA gene -----	75
Figure 3.17 Phylogenetic tree(ML) based on Hemagglutinin gene ---	75
Figure 3.18 Phylogenetic tree(ML) based on Elastase precursor... ----	76

제 1 장. 서 론 (INTRODUCTION)

치주 질환은 연조직에 국한된 치은염에서부터 경조직의 파괴를 동반하는 염증성 질환인 치주염까지 일컫는 질환으로, 치조골을 포함한 치주조직의 파괴로 인해 성인의 치아 상실을 초래하는 가장 심각한 질환 중 하나이다(Lee et al., 2001). 또한 치주 질환은 인간의 경조직 질환 중 가장 흔한 형태이며, 환자의 전신 건강 상태에 영향을 줄 수 있는 요인이기도 하다(Garlet et al., 2005). 치주 질환은 높은 유병률을 보이는 만성질환으로 2007년 국민건강영양조사에 따르면 만 35세 이상 성인의 74.6%가 치주 질환에 이환된 것으로 조사되었다. 2013년 건강보험 심사평가원의 통계자료에 따르면 보험급여 외래진료 다빈도 질환 순위에서 “치은염 및 치주 질환”은 “급성 기관지염”에 이은 두 번째이며, 해당 질환의 연간 지출 의료비는 4천936억 원에 달하였다.

치주조직과 밀접한 관련이 있는 치아의 표면에 부착된 치태는 치주 질환의 병인 요소 중 하나이다(Garlet et al., 2005). 사람의 구강 내에는 약 600종 이상의 호기성, 혐기성 박테리아가 상주하고 있으며(Aas et al., 2005; Paster et al., 2006), 이들 박테리아들은 치태 내에서 복잡하고 혼합된, 상호 의존적인 집락을 형성한다. 치태가 두꺼워지면서 성숙되면, 치태 내 세균 중 그람 음성의 혐기성 세균의 비중이 증가한다. 치주 질환에 이환된 자의 구강에서는 약 200여 종의 구강 미생물이 검출되었는데, 이중 약 10여 종이^a 국소적인

a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros*, *Selenomonas species*.

진행성 치주염이나 만성 치주염과 같이 사람의 구강 내에서 발생할 수 있는 수많은 경우의 치주 질환에 대한 원인균으로 인식되고 있다(Loomer, 2004). 이들 치주 질환 원인균들은 치주 조직에 염증을 일으키고, 숙주의 세포에 침입할 수 있는 충분한 능력을 갖는 병독성 인자들을 지니고 있으며, 이들은 내독소, 외독소, 효소 등 치주 질환의 다양한 과정에 관련되어 있다. 각각의 병원균은 숙주 조직의 항상성을 파괴하면서 그들이 지니고 있는 병독성 인자를 통해 병원성(pathogenecity)을 나타낸다. 치주 질환 원인균이 갖는 병독성 인자들은 치주조직을 파괴하는 인자들과 숙주의 면역작용을 억제하는 인자들로 구성된다. 치주조직을 파괴하는 인자들에는 lipopolysaccharide, gingipains, ‘trypsin-like protease’, cytotoxin, ‘butyric acid’, ‘factors-fimbriae’, ‘serine protease’, collagenase, ‘extra cellular protease’ 등이 있고, 숙주의 면역작용을 억제하는 인자들에는 leukotoxin, ‘distending toxin’, cytolethal, ‘inhibition of PMNS functions’ 등이 있다 (Haffajee & Socransky, 1994).

1.1 치주 질환 (Periodontal Disease)

치주 질환이란 치은, 치주인대, 치조골 등으로 이루어진 치아 지지조직에 발생하는 모든 질환으로, 구강 내의 일반적인 감염질환인 치은염과 치주염을 의미한다(Armitage, 1999). 이는 일차적으로 치아에 부착된 치태 및 치은연하 치주낭 내에 존재하는 치주 질환 원인균에 의해 발생하며, 이차적으로 구강 조직에 침입한 세균에 대하여 구강 상피세포, 결합 조직세포 및 다핵형 백혈구(polymorphonuclear leukocyte)와 같은 염증 세포가 생산한 프로스타글란딘(prostaglandin), 인터루킨(interleukin), ‘TNF - α ’ 등의 염증 매개 물질과 활성산소에 의하여 치주조직이 파괴되어 발생한다(Garlet et al., 2005). 1999년 AAP(American association of Periodontology)에 따르면 치주 질환은 8가지^b로 분류된다(Armitage, 1999). 병원체의 숙주 감염인 일반적인 감염과는 달리, 치주 질환은 구강 내 상주균의 균형 변화와 관련이 있다. 구강 상주균들은 숙주가 건강한 상태일 때는 아무런 질병을 일으키지 않다가, 항상성의 불균형이 초래되면 직접 조직을 침범하여 염증을 일으키거나, 간접적으로 세균 독소를 이용하여 병을 일으킨다. 숙주는 이러한 세균의 침입에 대하여 침범하는 세균을 포식하거나, 면역 복합체를 활성화 시키게 되는데 이때 파골세포가 활성화 되어 치조골이 파괴되게 된다.

1.1.1 치은염 (Gingivitis)

치은염은 염증성 치주 질환의 가장 익숙한 형태로, 전 세계적으로 50%-90%의 성인에게 영향을 미치며, 대부분의 청소년들도

b gingival diseases, chronic periodontitis, aggressive periodontitis, periodontitis as a manifestation of systemic diseases, necrotizing periodontal diseases, abscesses of the periodontium, abscesses of the periodontium, periodontitis associated with endodontic lesions, developmental or acquired deformities and conditions

치은염에 이환되어 있을 정도로 높은 유병률을 보인다(Albandar & Rams, 2002; Asikainen et al., 1986). 이는 치은 상피와 그 하방에 위치한 섬유 결합조직을 포함한 치은 연조직의 염증으로 그 범위가 제한된다(Cobb, 2008). 이러한 치은염은 치주조직을 파괴하는 치주염의 필수적인 요건이라 할 수 있으나, 모든 치은염이 항상 치주염으로 발전하는 것은 아니다(Asikainen et al., 1986). 모든 높은 유병률과 전 세계적인 발병에도 불구하고, 치태에 의한 치은염은 일반적인 구강위생 방법에 의해 방지가 가능하고, 쉽게 건강한 상태로 되돌릴 수 있다(Cobb, 2008).

치은염은 크게 임상적으로 치태에 의한 치은염과 치태를 제외한 다른 요인에 의한 치은 병변으로 분류할 수 있다. 치태에 의한 치은염은 다시 치태에 의한 치은염, 전신적인 요인에 의한 치은염, 약물복용에 의한 치은염, 영양실조에 의한 치은염으로 분류된다(Armitage, 1999). 치태란 치아 표면에 형성되는 세균막을 형성하는 복잡하고 다양한 미생물들의 집락으로, 치태 내에서 약 400여 종 이상의 구강 미생물이 서식한다(Signat et al., 2011). 구강 위생 과정 직후 건강한 치은 열구의 치태에는 그람양성 구균 특히, *Streptococcus* 종과 *Actinomyces* 종 등이 동일한 비중으로 존재하나, 시간이 지나 치태가 성숙될수록 *spirochaetes*나 이동성 간균과 같은 통성 혐기성 세균으로 구성된다(Kesic et al., 2008). 치태에 의한 치은염은 임상적인 부착소실이 없는 치은의 염증상태로 정의할 수 있으며(J. P., 2000), 치태의 성장과 치은 조직의 염증은 매우 밀접하게 관련되어 있다(Albandar & Rams, 2002). 임상적으로 치태 또는 치석이 존재하면 치은의 출혈, 부종, 색상변화, 견고성의 변화 및 표면 질감의 변화와 같은 외형적인 변화를 가져올 수 있다(AAP, 2000). 치태를 제외한 다른 요인에 의한 치은병변에는 특정 박테리아에 의한 치은염, 바이러스에 의한 치은염, 곰팡이에 의한 치은염, 유전적 요인에 의

한 치은염, 전신 상태의 반영으로 인한 치은염, 외상성 병변, 이물반응에 의한 치은염, 별도로 지정된 것이 없는 치은염이 있다 (Armitage, 1999).

치은염의 발전단계는 초기환부, 조기환부, 확립환부의 3단계로 구분 짓는다. 치아에 치태 축적 4일 이내에 치은염의 초기 환부가 발생한다. 치태는 주로 그람양성 구균으로 구성되며 치은에 급성 염증반응이 관찰된다. 환부에서는 치은열구액이 증가하며, 다형핵 백혈구(multinucleic leukocyte)가 모세혈관에서 치은열구로 이동한다. 접합 상피와 치은열구 상피 주변에는 염증성 침윤물이 존재하나, 치은염의 초기 환부는 임상적으로 관찰이 어렵다(Lang et al., 2009). 치태 축적 7일 후 부터는 임상적으로 관찰이 가능하다. 이 단계를 치은염의 조기환부로 구분 짓는다. 이 단계의 치은에는 산소 분압이 낮아지면서, 혐기성, 이산화탄소 요구성 미생물들이 더 많아진다. 조직학적으로는 대식세포가 대부분이며, 환부 주변으로 일부 교원질의 파괴가 나타나고 임상적 탐지가 가능한지 6일에서 12일이 지나고 나면 치은열구액의 흐름이 최고가 된다(J. P., 2000). 치은염의 확립 환부에서는 '*P. gingivalis*', '*P. intermedia*'와 같은 절대 혐기성 균의 증식이 가능해진 환경이 되고(Albandar & Rams, 2002), 치은 내에 위치한 염증의 크기가 더 커지면서 치주낭이 관찰되기도 한다(J. P., 2000). 하지만 이러한 환부는 몇 달 혹은 몇 년 간 치주 질환으로 진행하지 않은 채 머물기도 한다(Cobb, 2008).

1.1.2 치주염 (Periodontitis)

치주염은 치은염의 염증이 심해져, 치주인대와 치조골 등 심부 치주조직으로 확산되어 치아를 지지하는 뼈를 흡수하는 파괴성 염증성 질환이다(Cobb, 2008). 대부분의 치은염은 치주염의 발병으로 발전되며, 치은 염증 없이 발병하는 치주염에 관한 데이터는 보고된

바 없다(Albandar & Rams, 2002). 치주염은 임상적으로 몇 가지 그룹으로 분류할 수 있다(만성 치주염, 급진성 치주염, 전신질환과 관련된 치주염, 궤사성 치주 질환, 치주농양, 근관병소와 관련된 치주염, 발육성 또는 후천성 변형, Armitage, 1999).

만성 치주염은 치주 질환 중 가장 흔한 형태로 여성보다는 남성에게 빈번하게 발생한다. 만성 치주염의 심각도는 치주인대 섬유의 부착소실 정도에 따라 경도(1-2mm), 중등도(3-4mm), 중도(≥ 5 mm)로 나뉜다(Wiebe & Putnins, 2000). 이 질환은 특정한 파괴 양상 없이 전반적으로 대부분의 치아에 이환되어 진행되며, 치태와 치석의 침착과 직접적인 관련이 있다(Estrela et al., 2010). 급진성 치주염은 주로 유치 맹출 중 또는 맹출 직후, 영구치열의 1개 이상의 치아에서 치주조직이 급속히 파괴되는 염증성 치주 질환이다(Aberg et al., 2009). 급진성 치주염의 심각도는 만성 치주염과 마찬가지로 치주인대 섬유의 부착소실 정도에 따라 경도(1-2mm), 중등도(3-4mm), 중도(≥ 5 mm)로 나뉜다(Wiebe & Putnins, 2000). 이 질환에 이환된 병소에서는 주로 '*A. actinomycentemcomitans*'가 높은 빈도로 검출된다(Saglie et al., 1988). 전신질환과 관련된 치주염은 혈액질환과 관련된 치주염, 유전질환과 관련된 치주염, 특별히 분류되지 않은 치주염으로 나눌 수 있다. 궤사성 치주 질환은 궤사성 궤양성 치은염(Necrotizing ulcerative gingivitis)과 괴사성 궤양성 치주염(Necrotizing ulcerative periodontitis)으로 나누어진다. 치주농양은 치은농양(Gingival abscess), 치주농양(Periodontal abecess), 치관주위농양(Pericoronal abcess)으로 분류된다(Armitage, 1999).

치주염의 발전단계는 초기 병변, 조기 병변, 확립기 병변, 진행기 병변의 4단계로 구분 짓는다. 치주염 초기 병변의 발병 기전은 다음의 임상 개념을 포함한다. 즉, 치은연상 치태의 형성과 성숙 및

치은염의 형성, 세균성 치태와 만성 염증과정이 치은연하부분으로 확대, 치아의 결합조직 부착의 초기파괴, 점합상피의 수직적 확장과 치주낭 형성 및 치조골 소실 등이다. 치주 질환의 초기 병변은 치태 침착 후 4-7일 쯤부터 시작되며, 초기 병변이 지속되면서 급성 염증상태를 나타낸다. 이 단계에서는 섬유아세포의 병변이 시작되면서 변연치은까지 교원섬유가 소실되는 것이 관찰된다(Heitz-Mayfield et al., 2003). 치주 질환의 확립기 병변에서는 점합상피나 치은열구상피의 증식이 관찰되며 병변은 변형된 결합조직 쪽으로 이동한다. 급성 염증상황은 지속되고 있으며, 이때부터 치주낭이 형성되기 시작한다. 치주 질환의 확립기 병변은 만성 염증상태로 이행되면서 진행기 병변으로 넘어가지만 아직도 급성 혈관염의 증상은 지속된다. 확립기 병변에는 치주인대, 치조골에서도 관찰되고 치주낭이 존재하며 이 시기는 악화기와 휴지기를 갖는다(Cobb, 2008).

1.2 치주 질환의 병인론 (Etiology of Periodontal Disease)

1.2.1 숙주 요인(Host factors)

박테리아는 파괴적인 치주 질환을 스스로 일으키는데 꼭 필요한 요인이지만, 그 자체로 질환을 일으키기에 충분하지는 않다. 치주 질환이 시작되고 진행되기 위해서는 취약한 숙주가 필요하다(Offenbacher, 1996). 수십 년간, 치주 질환의 세균 요인에 대해 연구한 기간보다 더 오랜 기간 동안, 치주 질환의 서로 다른 패턴이나 심각성은 숙주의 감수성의 차이에 기인한다는 가설을 세워왔다. 연구 대상을 비교하기위해 이 분야의 연구와 더 나은 방법이 개발됨에 따라 치주 질환의 개시와 진행률에 영향을 미치는 몇 가지 숙주요인이 제안되었다(염증세포의 반응, 숙주의 영양상태, 임신, 당뇨, 혈액성 장애, AIDS, 흡연 등, Haffajee & Socransky, 1994).

치주 질환이 진행될수록 치주조직의 더 깊은 곳으로 염증세포가 침투한다. 비만세포(mast cell)의 경우, 치은염, 치주염에서도 그 정도와 반비례하여 나타난다. 비만세포의 과립은 세균의 영향, 내독소, IgE 매개 과민반응, 보체, 기계적 충격 등에 의해서 감소하게 되고 성공적인 치주치료 후에 비만세포는 다시 증가한다(Madianos et al., 2005). 다핵형 백혈구(polymorphonuclear leukocyte)는 치조 조직의 손상과 감염에 대한 숙주의 초기 방어에 중요한 역할을 한다. 치은연하의 치태가 치근단으로 급격히 증식하는 경우 다핵형 백혈구의 수가 급격히 감소하게 되며, 급진성 치주염 환자의 경우 포식작용이 저하된다. 병원균의 공격적인 자극이 제거되지 않고 지속되는 경우, 단핵세포에 의한 세포 침윤이 특징인 만성 치주염으로 진행된다. 치주염의 만성 염증 병변에는 대식세포(macrophage)가 수적으로 우세

하다. 이는 항원이 존재함으로써, 병원균을 죽이고, 염증 매개체를 생산함으로써 대식세포가 국소적인 면역반응에 관여하는 것으로 생각된다(Garlet et al., 2005). 대식세포는 세균의 내독소, 면역 복합반응 등의 자극에 반응함으로써 프로스타글란딘(prostaglandin), ‘cyclic AMP’, 교원질 분해 효소, 인터루킨(interleukin) 등을 분비하고 이 염증 매개 물질들은 골 흡수와 관련된 인자들에 작용한다(Madianos et al., 2005). 림프구의 경우, T 림프구가 확립된 만성 병변에 우세한 반면, B 세포와 형질세포의 비율은 질병이 진행 정도에 따라 함께 증가한다. 치주 질환 원인균에 대한 숙주의 면역반응은 그 병원균에의 감염으로부터 자신을 보호하기도 하지만, 지속적인 병원균의 침입과 악화된 면역반응은 오히려 염증세포로 하여금 숙주의 조직에 위험한 작용을 제공하게 한다(Garlet et al., 2005).

불충분하거나 부적당한 영양상태가 직접 치주 질환을 유발하지는 않지만, 감염에 대한 숙주의 감수성에 영향을 줌으로써 치주 질환의 유발과 진행을 촉진시킨다. 영양결핍은 치주조직의 상태에 영향을 미쳐, 국소 자극 인자나 교합력의 해로운 작용을 악화시킴으로써 치주조직 뿐 아니라 입술, 구강점막, 골조직에 이상을 가져오기도 한다. 특히 비타민 C의 경우 치주조직 내의 교원질 대사에 영향을 주어 조직의 재생과 회복 능력을 감소시키고 백혈구의 식균작용과 화학 주성을 감소시킨다. 결핍시 괴혈병이 나타나는데, 이는 각화성 피부염과 점상출혈을 보이며, 치은은 비대해지면서 궤양이 생겨 감염의 원인이 된다(Palacios et al., 2009).

임신 기간 중 여성 호르몬이 증가할 때 치은연하 세균들이 증가하여 치은염이 발생하는데, 이를 임신성 치은염이라고 한다. 임신 자체가 치은염을 야기하지는 않으며, 황체호르몬(progesteron)의 분비증가가 치은염을 쉽게 일으킬 수 있는 여건을 조성한다. 따라서

여러 국소적 인자에 의해 치은은 예민한 반응을 보이며, 치태조절을 잘하는 경우에도 발생할 수 있다. 치태조절이 잘 되지 않을 경우 매우 심해지며, 변연조직은 검붉게 증식되고 쉽게 출혈이 된다. 임신 부에서의 치주치료는 치주 질환의 개선을 위하여 안전하고 효과적이지만 조산과 저체중, 태아의 발생 저해 등과 치주 질환은 크게 관계하지 않는다(Michalowicz et al., 2006).

당뇨는 치주 질환의 발생 및 유병률의 증가와 밀접하게 관련이 있는 전신질환이다. 수많은 연구에서 인슐린 의존형 당뇨병(제1형 당뇨병)과 인슐린 비의존형 당뇨병(제2형 당뇨병)에서의 치주 상태를 다루어왔다(Zambon, 1996). 당뇨병이 적절하게 조절되는 환자에 있어서 치주 상태는 정상이고 감염에 대한 숙주 반응은 적절하게 일어나지만(Rosenthal et al., 1988), 그렇지 못한 환자들은 급성, 만성 치주 질환이 심각하고 치주농양이 형성되며 치아의 동요 또한 증가한다(Sakan-Seppala & Ainamo, 1992). 그러나 당뇨병 환자와 건강한 집단의 치은연하 치태의 미생물총(microflora)을 비교한 결과, 당뇨병 환자의 치주낭에서 연쇄상구균(streptococci)의 비중이 높게 검출될 뿐 치주 질환 원인균을 비롯한 다른 박테리아들의 검출 빈도 차이는 없었다(Sastrowijoto et al., 1989). 당뇨병은 그 자체만으로 숙주의 면역반응을 변화시켜 치주 질환에 이환 시 치조골의 상실이 심해지고 수술 후 창상치유가 지연된다(Haffajee & Socransky, 1994).

백혈병, 빈혈, 면역 결핍성 장애, 심혈관계 질환, 폐렴, 균혈증, 세균성 심내막염 등의 혈액성 장애의 초기 증상으로, 조절하기 어려운 치은의 비정상적인 출혈은 중요한 임상적 증상이다. 백혈병의 경우 모든 치은 점막이 푸른빛으로 변색되며, 치간 유두의 증식, 위막 형성, 괴사, 궤양 등을 동반하는 치은염 증상이 관찰된다. 치은 출혈 등은 치은염이 관찰되지 않은 경우에도 흔히 나타나며 백혈병

의 초기 증상이 될 수 있다(Holmstrup & Glick, 2002).

AIDS(후천성 면역 결핍 증후군, Acquired Immune Deficiency Syndrome) 환자들은 감염에 대한 숙주의 감수성에 변화가 생김으로써 HIV(인간 면역결핍 바이러스, Human Immunodeficiency Virus) 음성 집단에 비해 HIV 양성 집단의 치주 질환에 대한 유병률이 더 높고, 그 정도도 심각한 것으로 연구되었다(Haffajee & Socransky, 1994). AIDS 환자의 55%가 구강 내에서 부정형의 궤양, 카포시 육종 등의 다양한 구강 병소가 나타나며, 치주조직이 빠르게 붕괴되는 것으로 관찰되었다. 치주조직에서 채취한 치태 샘플을 검사한 결과, HIV 양성 집단과 HIV 음성 집단의 치은연하에서 검출된 구강 미생물들의 종류는 매우 비슷한 것으로 나타났다. 다만, '*P. gingivalis*', '*P. intermedia*', '*A. actinomycentemcomitans*', '*F. nucleatum*' 등이 건강한 사람들에 비해 HIV 양성 집단에서 더 빈번하게 검출되었다(Murray et al., 1989). 그러나 모든 HIV 양성 집단에게서 치주 질환이 관찰 되는 것도 아니고, 국소적인 병변의 제거, 구강 세척 또는 항생제 복용 등의 일반적인 치주치료 방법으로도 성공적으로 치료가 가능한 것으로 연구되었다(Haffajee et al., 1988).

흡연은 치주 질환의 유병률과 위험도를 증가시키는 위험인자로, 관련된 연구가 광범위하게 진행되어왔다(Zambon et al., 1996). Stoltenberg 등은 흡연과 5가지 치주 질환 원인균과의 관계를 확인하고자 흡연자와 비흡연자의 구강 내 해당 박테리아의 빈도를 비교하였으나, 두 집단 간의 차이를 확인하지 못하였다(Stoltenberg et al., 1993). 그러나 Zambon 등의 연구는 흡연자는 치은연하에 '*T. forsythia*'를 심각하게 높은 수준으로 품고 있으며, '*T. forsythia*'에 감염될 위험도 비흡연자에 비해 현저히 높음을 보여주었다(Zambon, 1996). 흡연자는 비흡연자에 비해 치석이 더 많이 침착되고 부착 소실도 더 크며, 치근이개부 병소와 치조골 파괴 정도도 심한 것으로

나타난다(Garcia, 1988).

1.2.2 세균요인(Bacterial factors)

일반적으로 치주 질환의 원인균으로 추정되는 세균들은 다음의 5가지 기준에 충족되는 경우, 그 병원균을 치주 질환 원인균이라 정의할 수 있다. 즉, 질병과의 연관성, 제거 시 질병의 호전 여부, 숙주의 반응, 병독성 인자, 동물연구 등이다(Kesic et al., 2008). 질병과의 연관성은 그 종에 감염되어 생긴 질병에 이환되었을 경우, 그 질병에 이환되지 않거나, 다른 질병에 이환된 사람들에 비해 더 빈번하게, 더 많이 해당 종이 검출되어야 함을 의미한다. 제거의 기준은 그 종의 제거는 반드시 그 질병의 일시적인 소강상태를 동반해야 함을 의미한다. 숙주의 반응은 면역반응을 의미한다. 즉, 병원균(또는 그 항원)이 치주조직에 손상을 일으키면, 숙주는 특별히 그 병원균에 대한 항체를 생성하거나 세포 면역반응을 보일 것이다. 따라서 숙주의 반응은 병원균에 대한 신호로써 작용할 수 있다. 생화학적 결정요인으로서의 병독성 인자는 해당 종의 병원성에 대한 중요한 단서를 제공할 수 있다. 특정 병원균이 갖는 특징이나 그 병원균에 의해 생산된 독성을 가진 대사물질은 그 질병의 진행에 어떤 역할을 할 수 있음을 제안한다. 동물모델 시스템은 미생물 종이 인간의 질병에서도 그 역할을 수행할 수 있음을 시사하는 증거가 된다. 특히 주목할 만한 점은 개나 원숭이에게 실험적으로 유도된 질병이다. 이는 질병을 유도하거나 유도하지 않도록 한 가지 종 또는 그 종의 하위 조직을 선택하고 조작할 수 있기 때문이다(Haffajee & Socransky, 1994).

이들 기준을 충족시키는 치주 질환 원인균들은 주로 그람 음성 세균이며, 절대 혐기성 세균으로 ‘*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*’, ‘*Porphyromonas gingivalis*’, ‘*Prevotella*

intermedia', '*Tannerella forsythia*', '*Fusobacterium nucleatum*', '*Capnocytophaga species*', '*Campylobacter rectus*' 등이 있다(Kesic et al., 2008). 치주 질환을 유발하는 원인균의 병독성 인자들에 대한 많은 연구가 이루어져 왔으며, 병독성 인자에 의해서 미생물은 군락을 형성하고 숙주의 방어 기전을 극복하며, 질병을 진행시킨다. 개체들이 가지는 병독성 인자들은 병원성(pathogenic)을 가지고 있다. 세균이 병독성을 나타내기 위해서는 숙주와의 접촉이 필요하다. 구강의 경우 저작, 연하, 발음 등의 동작이 끊임없이 일어나기 때문에 세균이 구강 내의 상피세포와 접촉하기 위해서는 특별한 단백질을 필요로 하고, 이를 부착인자(adhesion) 라고 한다. 세균막 위에 존재하는 부착인자는 타액 속의 특별한 수용기와 부착 가능하며, 치아의 표면이나 상피세포의 세포외막에 부착한다(Meyer et al., 1996). 치주염은 치아를 지지하는 주변의 골소실(bone loss)이 특징적이다. 치주 질환 원인균들은 지질다당류(lipopolysaccharide), 단백질 분해효소 민감인자, 표면 관련물질 등 다양한 종류의 골흡수(bone resorption)에 관여하는 물질을 분비함으로서 병독성 인자들로 작용한다. 한편 숙주에서 세포와 조직의 파괴에 관여하는 내독소는 골흡수, 피부괴사, 대식세포의 작용방해 등을 통해 치주조직 파괴에 가장 큰 역할을 하며, '*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'의 Lipopolysacchride가 대표적인 치주 질환 원인균에서 발견된 내독소이다(Kiley & Holt, 1980). 숙주세포는 치면세균막을 조절하기 위해 숙주의 면역시스템을 가동한다. 치주 질환 원인균은 면역 억제작용을 하는 여러 단백질들을 분비함으로써 이러한 숙주의 DNA, RNA의 형성을 저해하며, 세포분열 능력까지도 저해한다. 국소적인 급진성 치주염을 치료하기 위해서는 기계적인 치료 이외에 테트라사이클린(Tetracycline), 메트로니다졸(Metronidasole) 등의 항생제의 처방이 이루어진다. 그러나 연구에 따르면 치주 질환 원인균들에게서 이들 항생제에 대한 내성이 관찰되기도 한다(Roe et al, 1995).

(1) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

‘*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*’는 과거에 ‘*Actinobacillus actinomycetemcomitans*’라 불렸으며, 그람음성의 절대 혐기성, 비이동성의 당을 분해하는 간균에 속한다(Haffajee & Socransky, 1994). ‘*A. actinomycetemcomitans*’는 호 이산화탄소성 세균으로 섬모를 갖고 있으며, 아가(agar)를 포함한 혈액 배지에서 불규칙한 변연을 갖는 집락을 형성한다. ‘*A. actinomycetemcomitans*’는 구강내 상주균이지만, 치주 질환, 뇌종양, 심내막염 등의 여러 가지 감염성 질환과 관련이 있다(Zambon et al., 1983). 이는 건강한 치주 조직이나 치은염, 치아가 없는 실험 대상자의 구강에서보다는, 국소적인 급진성 치주염의 병변에서 검출 빈도와 수가 증가한다(Asikainen et al., 1986; Saglie et al., 1988). 국소적인 급진성 치주 질환에 이환된 사람들의 대부분이 이 종에 대한 혈청 항체반응이 기하급수적으로 증가하였고(Ebersole et al., 1980), 이 질병에 이환된 환자들이 성공적으로 치료를 받은 경우, ‘*A. actinomycetemcomitans*’는 제거되었거나, 매우 낮은 수 만 존재하였다(Haffajee et al., 1988). ‘*A. actinomycetemcomitans*’의 지금까지 밝혀진 병독성 인자로는 leukotoxin, collagenase, endotoxin, epitheliotoxin, ‘fibroblast inhibitory factor’, ‘bone resorption inducing factor’, ‘induction of cytokine production from macrophages’, ‘modification of neutrophil function’, ‘degradation of immunoglobulins Invades epithelial cells *in vitro*’가 있다(Haffajee & Socransky, 1994). 이중 leukotoxin은 ‘*A. actinomycetemcomitans*’의 병독성 인자들 중에서 가장 연구가 많이 된 부분으로, 국소 급진성 치주염 환자의 56%에서 분리되었다(Zambon et al., 1983). ‘*A. actinomycetemcomitans*’는 leukotoxin을 분비하여 호중구와 단핵백혈구의 세포막을 변화시킴으로써 식세포 반응과 chemostatic 반응에 변화를 가져옴으로써 숙주의 방어 메커니즘

을 악화시킨다(Sbordone & Bortolaia, 2003). ‘*A. actinomycentemcomitans*’의 병독성 인자들과 각각의 기능에 대해서는 Table1.3에 나열하였다. 한편, 무균상태의 쥐에 ‘*A. actinomycentemcomitans*’를 감염시켜 치주 질환을 유도하는데 성공하였다(Chalaby & Saglie, 1989). 또한 ‘*A. actinomycentemcomitans*’는 생체외 실험에서 사람의 치은 상피세포를 손상시킬수 있음을 보여주었다(Sreenivasan et al., 1993).

(2) *Phorphyromonas gingivalis*

‘*Phorphyromonas gingivalis*’는 과거에 ‘*Bacteroides gingivalis*’라 불렸으며, 그람음성의 혐기성, 비이동성의 당을 분해하지 못하는 간균에 속한다(Kesic et al., 2008). ‘*P. gingivalis*’는 혈액/agar 배지에서 갈색/검은색의 집락을 형성하는 *Bacteroides*그룹에 속한다(Burdon, 1928). ‘*P. gingivalis*’와 다른 ‘black-pigmented *Bacteroides*’^c 들은 특정 혼합 감염 실험에서 그들의 중요한 역할(Macdonald et al., 1963)과 그들이 생산하는 병독성 인자들로 인해 학계에서 관심의 대상이 되었다. 이 멤버들은 병독성 인자로써 gingipain, collagenase과 같은 각종 단백질 분해효소(면역 글로불린을 파괴하는 것들을 포함), ‘capsular polysaccharide’, Fimbriae, endotoxin, ‘fatty acids’, NH, H, S, indole 등을 갖는다(Haffajee & Socransky, 1994). Cysteine 단백질 가수분해효소인 ‘Arg-gingipain(Rgp)’과 ‘lys-gingipain(Kgp)’은 ‘*P. gingivalis*’가 분비하는 대표적인 병독성 인자로, 단백질 가수분해효소에 의해 활성화되는 수용체(protease-activated receptor)를 자극함으로써 ‘*P. gingivalis*’의 생존과 병독성 발현에 많은 기능을 제공한다. ‘Arg-gingipain(Rgp)’은 ‘*P. gingivalis*’의 생존을 위해 필요한 영양분을 모으는데 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. Rgp는 숙주인 사람의 알부민 세럼(serum)을 분해하여 박테리아에 풍부한 질소와 탄소

^c *Phorphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedius*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella loescheii* 등

원을 제공하며 또한 '*P. gingivalis*'가 여러 가지 세포기능을 수행하는데 필요한 철 성분을 제공한다. Gingipain은 또한 숙주로의 침입과 숙주에서의 집락을 형성하기 위해 필요한 수많은 기능을 한다. Rgp는 'long fimbriae'를 구성하는 단백질의 전구체를 처리함으로써 부착과 침입에 필요한 기능을 한다. RgpA, Kgp, 'hemagglutinin A (HagA)'를 암호화 하는 '*P. gingivalis*'의 유전자는 '*T. denticola*'와 함께 있을 때 강하게 발현된다. Hemagglutinin의 부착 도메인을 갖는 단백질은 '*P. gingivalis*'의 부착 능력을 높이기 위해 다른 박테리아 종들과 함께 작용한다. 'Lys-gingipains(Kgp)'은 fibrinogen이나 fibronectin과 같은 고정화된 기질 단백질에 결합함으로써 숙주에 집락을 형성하는 기능을 한다. Gingipains은 또한 숙주의 면역반응의 다양한 신호들을 분해시키는 능력이 있다. 이는 '*P. gingivalis*'가 IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , IL-8과 같은 염증성 cytokine과 IgG 항체의 아형인 IgG¹과 IgG³을 분해함으로써 숙주의 면역반응을 손상시킬 수 있음을 의미한다. Rgp는 또 T-cells의 신호 전달과 세포분열을 조절함으로써, T-cells에 있는 IL-2의 축적을 저해하여 '*P. gingivalis*'로 하여금 숙주의 후천성 면역반응을 피할 수 있도록 한다. 치주 질환에서 Gingipains은 fibronectin, 콜라겐, 'matrix metalloprotein'을 분해함으로써 치주조직을 손상시키는 중요한 요인이다. 이들 기질의 분해는 숙주의 세포와 세포외 기질사이의 상호작용을 방해함으로써 치주조직의 파괴와 상처의 치유를 지연시키는 결과를 가져온다. Rgp는 숙주의 염증반응을 일으킴으로써 치주조직과 치조골의 파괴에 관여하기도 한다. 쥐의 농양 실험 결과 '*P. gingivalis*'의 캡슐화된 스트레인 은 그렇지 않은 스트레인보다 훨씬 더 독성이 있는 것으로 나타났다. 이 캡슐은 치주 질환에서 관찰되는 염증병변 발생과 관련이 있는 'capsular polysaccharide'로 구성되며, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α 과 같은 전염증성 cytokine의 생산을 하향 조절하는 것과 같은 숙주의

면역회피반응에서 관찰된다(Signat et al., 2011). 세포부착에 관여하는 Fimbriae는 많은 그람음성, 그람양성 박테리아에서 관찰되며, '*P. gingivalis*'의 독성과 많은 관련이 있다. Fimbriae는 부착, 침입, 집락에 매우 중요한 요소로, 막세포의 숙주 세포의 침입에 중요한 작용한다. 이들은 '*P. gingivalis*'를 숙주 세포에 부착할 수 있도록 함으로써 숙주세포의 항상성이 유지될 수 없도록 하여 세포내 면역회피반응을 유도한다. '*P. gingivalis*'는 'long fimbriae', 'short fimbriae', 그리고 FimC, FimD, FimE 와 같은 'accessory fimbriae'들을 갖는다. 'Long fimbriae (FimA)'는 'major fimbriae'로, 길고 섬유모양이다. 이는 치태 내에서 '*P. gingivalis*'의 부착에 관여하며, 숙주세포로의 침입과 집락형성을 조절하는 부착요소로써 작용한다. 'Short fimbriae (Mfa1)'는 'minor fimbriae'로 'long fimbriae'와는 다른 작용을 한다. 이는 소집락형성과 세포와 세포간의 응집에 꼭 필요한 요소이며, 치태 내에 공존하는 다른 구강 미생물들과의 세포와 세포간의 부착에 관여한다. FimC, FimD, FimE와 같은 'accessory fimbriae'는 'FimA protein'의 기능과 깊은 관련이 있으며, '*P. gingivalis*'와 기질 단백질 사이의 결합에 중요한 역할을 한다. 이와 같이 '*P. gingivalis*'는 'gingipain proteases', 'capsular polysaccharide', 숙주의 세포 증식유도, 호중구 보충에 필요한 chemokines의 분해 등을 통해 숙주의 면역 회피반응에 영향을 줄 수 있다. '*P. gingivalis*'는 치주 질환에 이환된 병변 또는 활동성 병변에서 그 수가 증가하나, 건강한 치주 또는 치은염에서는 그 수가 적다(Christersson et al., 1992). 또 '*P. gingivalis*'는 치주 질환에 이환되었던 병변이 치료되면 그 수도 성공적으로 감소하나, 일반적으로 치주 질환이 재발하여 사후 치료하는 경우 또 발견되기도 한다(Winkelhoff et al., 1988). '*P. gingivalis*'는 다양한 형태의 치주 질환에 이환된 사람들에게 전신적인 또는 국소적인 면역반응을 증가시킨다. Ogawa 등은 진행된 치주 질환의 병변에 있는 혈장

(plasma) 세포의 약 5% 정도가 '*P. gingivalis*'의 섬모에 대한 항체를 형성하였음을 연구하였다. 이 연구는 전부는 아니지만, 치주조직이 부착소실을 보이는 치주 질환에 이환된 대부분의 사람들은 '*P. gingivalis*'의 항원에 대하여 높은 수준의 항체를 갖는 것을 보여주었다(Ogawa et al., 1989). '*P. gingivalis*'와 같은 개체는 개나 양, 원숭이에게서 자연 발생 또는 결찰로 인해 발생한 파괴적인 치주 질환과 밀접한 관련이 있다. 즉, 개나 원숭이, 양에게서 결찰에 의해 치주 질환이 발생했을 때 관찰된 '*P. gingivalis*'의 수준은 탐지된 질환의 병변의 수가 증가할수록 함께 증가하였고, 자연발생의 치주 질환의 경우 병변이 없는 곳보다 병변이 있는 곳에서 높은 수의 '*P. gingivalis*'가 발견되었다(McCourtie et al., 1990; Ebersole & Kornman, 1991). '*A. actinomycetemcomitans*'처럼 '*P. gingivalis*'도 생체의 실험에서 사람의 치은 상피세포를 손상시킬 수 있음을 보여주었다(Sandros et al., 1993). 특히, 치태와 관련된 상피세포에서 보다는 치주낭에서 복구된 상피세포에서 더 많은 수의 '*P. gingivalis*'가 관찰되었다(Dzink et al., 1989).

(3) *Prevotella intermedia*

'*Prevotella intermedia*'는 치은염과 치주염 등의 치주 감염에 관련이 있는 그람음성, 절대 혐기성의 병원균이다(Kesic et al., 2008). '*P. intermedia*'는 두 번째 'black-pigmented *Bacteroides*'로, 당을 분해하지 않는 '*P. gingivalis*'나, 당을 완전히 분해하는 '*Prevotella nigrescens*'와 같은 다른 'lack-pigmented *Bacteroides*'들과는 달리, 중간 수준으로 당을 적당히 분해한다(Haffajee & Socransky, 1994). '*P. intermedia*'는 종종 급성 궤사성 궤양성 치은염과 특정 치주 질환에서 그 수가 증가된 상태를 보인다(Loesche et al., 1982; Dzink et al., 1983). 또한 이 종은 병독성 인자로써 collagenase와 각종 단백질 분

해효소 (면역 글로불린을 파괴하는 것들을 포함), endotoxin, ‘fatty acids’, NH, H, S, indole 등을 생산하는데, 이는 ‘*P. gingivalis*’에서 관찰할 수 있었던 병독성 인자들과 동일하다(Haffajee & Socransky, 1994). Okamoto 등은 치은 연하에서 채취한 ‘*P. intermedia*’에서 높은 ‘hemagglutinating activities’를 확인할 수 있었으며, 이는 ‘*P. intermedia*’의 병독성이 치주질환의 진행과 관련이 있음을 의미한다는 것을 연구를 통해 확인하였다(Okamoto et al., 1999). ‘*P. intermedia*’는 동물 실험에서 주입된 동물에게서 혼합 감염을 일으킬 수 있다. 그러나 이런 실험적인 농양 연구에서의 혼합 감염이 사람의 치주 질환에도 적절하게 적용될 수 있는지는 아직 불확실하다(Macdonald et al., 1956). Guan 등은 ‘*P. intermedia*’가 혈전(thrombotic) 또는 염증(inflammatory) 인자를 통해 전신 질환의 기전에 중요한 역할을 할 수 있음을 제안하였다. ‘*P. intermedia*’는 사람의 치주 인대 세포에서 여러 신호 전달 경로를 통해 ‘tissue-type plasminogen activator’와 ‘plasminogen activator inhibitor-2’의 발현을 자극하며, ‘*P. intermedia*’의 lipopolysaccharide는 산화질소(nitric oxide)와 ‘interleukin-6’, 그리고 ‘nuclear factor-kB’를 활성화하는 것이 연구를 통해 밝혀졌다(Guan et al., 2011). 한편, 치주 질환에 이환된 환자들 중에서 고질적인 치주 질환에 이환된 환자들 모두에게 ‘*P. intermedia*’에 대한 혈청항체가 증가하지는 않았다(Haffajee et al., 1988). 최근에는 동일한 표현형의 특징을 보이는 ‘*P. intermedia*’의 strain이 ‘*P. intermedia*’와 ‘*Prevotella nigrescens*’의 2가지의 종으로 분리되었음이 연구되었다(Shah & Gharbia, 1992).

(4) *Tannerella forsythia*

‘*Tannerella forsythia*’는 과거에 명칭이 ‘*B. forsythus*’에서 ‘*Tanerella forsythensis*’로 바뀌어 불렸다가 다시 현재의 명칭으로 고

작되었으며, 그람음성의 혐기성이고, 다양한 모양을 갖는 방추형 간균에 속한다(Haffajee & Socransky, 1994). 1979년에 방추형 *Bacteroides*로써 처음 표현되었다(Tanner et al., 1987). '*Tannerella forsythia*'는 '*P. gingivalis*', '*Treponema denticola*' 와 함께 'red complex bacteria' 그룹에 속하며, 심각한 치주 질환과 관련이 있다(Rocas et al., 2001). 건강한 부위나 치은염이 발생한 부위보다는 파괴성 치주 질환에 이환된 부위 또는 치주농양 부위에서 더 많이 발견되고(Lai et al., 1987), 비활동성 병소보다는 활동성 병소에서 더 많이 발견된다(Dzink et al., 1988). 건강한 치주조직에서의 병변발생과 관련이 있다. '*T. forsythia*'는 소량의 집락을 배양하기 위해 7-14 일 정도가 소요될 정도로 배양이 쉽지 않다. 그러나 '*F. nucleatum*'과 함께 배양하면 성장속도가 훨씬 빨라진다고 보고 되었다(Socransky et al., 1988). 한편, '*T. forsythia*'는 특이하게 N-acetylmuramic을 필요로 하는데, 배양 시 이를 첨가하면 성장속도가 확연히 빨라진다. '*T. forsythia*'의 배양의 어려움 때문에 처음에는 상대적으로 흔하지 않은 치은연하의 상주균이라 생각하였다. 그러나 'DNA-DNA hybridization' 기술을 사용하면서 '*T. forsythia*'가 치주낭에서 채취한 상피세포에서 가장 흔하게 검출되는 종임이 밝혀졌다(Dibart et al., 1994). Listgarten 등은 고질적인 치주 질환에 이환되어있는 집단에게서 가장 빈번하게 검출되는 종이 '*T. forsythia*'임을 밝혔다(Listgarten et al., 1993). '*T. forsythia*'에 대한 혈청 항체가 치주 질환에 이환된 사람들에게서 증가하고, 특히 고질적인 치주 질환에 이환된 집단에서는 매우 높게 나타난다(Taubman et al., 1992). '*T. forsythia*'는 사람과 동물에서 모두 치주병원성 세균으로 작용한다. 이는 세포자멸사를 유도하고, '*in vitro*'나 '*in vivo*'에서 표피 세포에 침투할 수 있다. 병독성 인자로써는 내독소, 지방산 및 methylglyoxal 등이 있다(Haffajee & Socransky, 1994).

(5) *Fusobacterium nucleatum*

‘*Fusobacterium nucleatum*’는 그람음성, 혐기성이고, 비운동성이며, 서로 다른 길이의 방사모양 간균 또는 방사모양의 막대균에 속하며(Haffajee & Socransky, 1994), 대략 100년 동안 치은연하의 상주균으로 인식되고 있다(Plaut, 1894). ‘*F. nucleatum*’은 서로 다른 임상 상태의 치태 샘플을 분리하여 검사하였을 때, 치태 내에 수적으로 우세하게 존재함으로써 치은연하의 치태 샘플에서 가장 빈번하게 분리되는 세균이다. 구강 미생물들이 치태 내에 집락을 형성하는 과정에서 ‘*F. nucleatum*’은 그람양성균과 그람음성균들의 물리적인 상호작용의 중간적인 위치에 있으면서 공생하는 구강 미생물들, 특히 구강질환 원인균들이 치아 또는 구강상피 세포 위에 부착하는 것을 돕는 매개 이주종(intermediate colonizer)이다. 특히 ‘*P. intermedia*’는 ‘*F. nucleatum*’ 없이는 검출되지 않은 것으로 보아 ‘*P. intermedia*’의 집락 형성에 ‘*F. nucleatum*’의 역할이 필수적임을 알 수 있다. 또 ‘*F. nucleatum*’은 복잡한 구강환경에서 질병상태와 건강상태 사이의 균형을 유지하는 역할을 하는 beta-defensins이나 LL-37과 같은 항균성 펩타이드를 하향 조절하여 숙주의 면역을 저하시킴으로써 다른 박테리아와 관련된 독성 메커니즘에 영향을 미칠 수 있으며, 이러한 ‘*F. nucleatum*’의 면역 억제기능은 치주 질환의 시작과 진행에 매우 중요한 역할을 한다. ‘*P. gingivalis*’나 ‘*T. denticola*’를 포함한 여러 치주 질환 원인균들은 병독성 인자로서 단백질 분해 효소들을 분비한다. ‘*F. nucleatum*’도 병독성 인자로서 serine 단백질 분해 효소를 분비하는데, 이는 세포외기질 단백질인 fibrinogen과 fibronectin을 비롯한 collagen I과 collagen IV를 분해시키고, IgA의 α 체인을 소화시킴으로써 치주조직을 손상시킴과 동시에 박테리아에 의한 숙주의 면역체계의 회피를 돕는다(Signat et al., 2011). ‘*F. nucleatum*’은 치주 질환과 치주농양을 가진 사람의 치주조직에 널리

분포하며, 사람에서 뿐만 아니라 다른 포유류에서도 관찰이 가능하다(Dzink et al., 1988). ‘*F. nucleatum*’은 ‘*P. gingivalis*’ 와 같이 치태 외에도 다른 기관에 부착할 수 있는 능력이 있다. 즉 치주 질환뿐만 아니라 머리, 목, 가슴, 복부, 간 등에 감염되어 ‘tropical skin ulcers’, ‘peritonsillar abscesses’, pyomyositis, ‘septic arthritis’, bacteremia, ‘liver abscesses’, ‘intrauterine infections’, ‘bacterial vaginosis’, ‘urinary tract’ 과 같은 질병을 일으킬 수도 있다(Signat et al., 2011).

Table 1.1 Scientific classification of ‘*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*’ and ‘*Porphyromonas gingivalis*’.

Classification	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>
Kingdom	Bacteria	Bacteria
Phylum	Proteobacteria	Bacteroidetes
Class	Grammaproteobacteria	Bacteroidetes
Order	Pasteurellales	Bacteroidales
Family	Pasteurellaceae	Porphyromonadaceae
Genus	<i>Aggregatibacter</i>	<i>Porphyromonas</i>
Species	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>

Recent studies have shown a phylogenetic similarity of ‘*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*’ and ‘*Haemophilus aphrophilus*’, ‘*Haemophilus paraphrophilus*’, and ‘*Haemophilus segnis*’ suggesting the new genus *Aggregatibacter* for them.

Table 1.2 Virulence factor of ‘*A. actinomycetemcomitans*’ (Fives-Taylor et al., 1993).

Function of Virulence factor	Virulence factors
Promote colonization and persistence in the oral cavity	Adhesins
	Invasins
	Bacteriocins
	Antibiotics resistance
Interfere with the host defenses	Leukotoxin
	Chemotactic inhibitors
	Immunosuppression factors
	Fc-binding proteins
Destroy host tissues	Cytotoxins
	Collagenase
	Bone resorption agents
	Stimulator of inflammatory mediators
Inhibit host repair of tissues	Inhibitors of fibroblast proliferation
	Inhibitors of bone formation

Table 1.3 Scientific classification of '*Prevotella intermedia*', '*Tannerella forsythia*', '*Fusobacterium nucleatum*'.

Classification	<i>P. intermedia</i>	<i>T. forsythensis</i>	<i>F. nucleatum</i>
Kingdom	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Phylum	Bacteroidetes	Bacteroidetes	Fusobacteria
Class	Bacteroidia	Bacteroidia	Fusobacteria
Order	Bacteroidales	Bacteroidales	Fusobacteriales
Family	Prevotellaceae	Porphyromonadaceae	Fusobacteriaceae
Genus	<i>Prevotella</i>	<i>Tannerella</i>	<i>Fusobacterium</i>
Species	<i>P. intermedia</i>	<i>T. forsythensis</i>	<i>F. nucleatum</i>

1.3 구강 미생물의 계통수 (Phylogenetic tree of oral microbes)

계통수(Phylogenetic Tree)는 생물의 진화과정을 나무의 줄기와 가지의 관계로 나타낸 것으로 생물이 진화의 결과 여러 종이나 분류군 사이에서 나타나는 신체적이거나 유전적 특징의 유사성과 차이를 바탕으로 각 생물간 친연 관계를 나타낸 다이어그램이다. 독일의 팔라스에 의해 처음 만들어졌으나, 현재 동물에서는 신혜켈과의 계통수, 식물에서는 엥글러의 분류계 계통수를 따르고 있다 (Brinkman & Leipe, 2001).

현재 지구상에 존재하는 생물종의 계통분류 체계는 크게 고세균, 세균, 진핵생물의 3가지로 나뉜다. 대부분의 사람 병원균을 비롯한 수많은 구강 미생물들이 속한 세균 또는 박테리아는 생물의 주요 분류군으로 보통의 생물체 세포에서 관찰되는 핵, 미토콘드리아, 리보솜과 같은 세포소기관을 갖지 않은 원핵생물을 포함한다. 세균의 세포벽은 탄수화물과 아미노산으로 이루어진 매우 얇은 막으로 펩티도글리칸 구조를 이루며, 세포벽의 형태에 따라 외막이 없는 그람양성 세균과 외막이 있는 그람음성 세균으로 구분한다. 세균은 단세포로 이루어져 있으며 형태에 따라 구균, 간균, 나선균으로 분류된다. 세균류는 지구상의 어느 곳에서든 부생, 기생, 공생 또는 독립생활을 하며 살아간다. 이 중 다른 생물체나 그 생산물에 의지하여 생활하는 경우에는 복잡한 유기물을 분해함으로써 필요한 에너지를 얻는다.

계통 발생적으로 분류되는 고등생물과는 달리 세균은 형태학적인 특징이 충분하지 않아 고등생물처럼 분류할 수 없다. 따라서 세균은 실험실에서 세균동정에 이용되는 형태, 염색특성, 배양조건,

생화학적 반응, 항원구조 등과 같은 표현형적 특징에 따라 분류되어 왔으나, 이러한 방법은 시간이 많이 소요될 뿐만 아니라, 수많은 종을 분류하기에는 그 기준이 이를 뒷받침할 만큼 다양하지 않아 분류에 있어 한계를 가진다. 따라서 기존의 동정 방법들을 통해서 할 수 없었던 세균들의 동정을 가능하게 한 분자생물학적 동정 방법의 사용은 질병을 일으키는 세균들을 동정하는데 있어서 그 중요성이 갈수록 커져가고 있다(Haffajee & Socransky, 1994).

분자생물학적 동정 방법에서 구강 미생물 동정 및 분류에 주로 이용되는 유전자는 ‘16S rRNA’ 유전자이다. ‘16S rRNA’ 유전자의 염기서열은 몇 군데의 변이부분을 제외하고는 잘 보존되며, 많은 구강 미생물에 대한 ‘16S rRNA’ 유전자의 염기서열이 밝혀지고 있다(Zambon, 1996). 현재까지 구강 미생물의 계통수를 작성하기 위해 다양한 유전자 마커가 이용되었으며, 다양한 구강 미생물이 존재하는 만큼 Phylum(문)에 따라 그들을 분류한 연구와 그들의 전체 유전자 서열을 저장해 놓은 데이터베이스가 국내외에 구축되어 있다. 2010년 구강 미생물의 정확한 계통수를 작성하기 위해 HOMD(Human Oral Microbiom) 프로젝트가 Dewhirt 등에 의해 진행되었다. HOMD는 사람의 구강에서 얻은 36,043개의 ‘16S rRNA’ 유전자 클론 시퀀스를 분자생물학적 동정 및 분류 방법을 이용하여 약 600여종의 구강 미생물을 찾아 정의하고, 분류하였다. 총 619개의 구강 미생물이 13개의 문(Phylum)으로 분류되었다. 여기에서 분류된 13개의 문(Phylum)은 방선균문(Actinobacteria), 의간균문(Bacteroidetes), 클라미디아균문(Chlamydiae), 녹만균문(Chloroflexi), 유리아케오타문(Euryarchaeota), 후벽균문(Firmicutes), 푸소박테리움균문(Fusobacteria), 프로테오박테리아문(Proteobacteria), 스피로헤타문(Spirochaetes), 시네르기스테스균문(Synergistetes), 테네리쿠테스문(Tenericutes), SR1, TM7이다(Dewhirt et al., 2010). Table 1.4는 HOMD

에서 유전자 서열에 기반하여 13개의 Phylum에 따른 구강 미생물의 분류체계 및 해당 Phylum에 속한 종들의 수를 나타낸 것이다.

세균의 형태학적 분류의 한계로 유전자 서열을 이용한 구강 미생물의 분류의 중요성이 커지고 있다(Brinkman & Leipe, 2001). 지금까지의 연구결과 치아, 치주낭, 혀, 볼, 경구개, 연구개, 설배 등 서로 다른 구강 구조와 조직에 서식하는 세균들은 뚜렷이 구분된다(Mager et al., 2003). 이곳에 서식하는 사람의 구강에 상재하는 복잡한 세균들은 종의 다양성이 매우 높고, 배양하기 힘들거나 불가능한 세균들이 많기 때문에 이들을 종, 속, 과, 목, 강, 문, 계의 분류체계에 맞추어 체계적으로 분류하는 데에는 한계가 있다(Haffajee & Socransky, 1994).

Table 1.4 Phylogenetic distribution of 619 taxa in HOMD (Dewhirst et al., 2010).

Phylum	No.(%) of Taxa	Named	Unnamed
<i>Bacteria</i>			
<i>Firmicutes</i>	227 (36.7)	120 (52.9)	107 (47.1)
<i>Bacteroidetes</i>	107 (17.3)	39 (36.4)	68 (63.6)
<i>Proteobacteria</i>	106 (17.1)	70 (66.0)	36 (34.0)
<i>Actinobacteria</i>	72 (11.6)	37 (51.4)	35 (48.6)
<i>Spirochaetes</i>	49 (7.9)	11 (22.4)	38 (77.6)
<i>Fusobacteria</i>	32 (5.2)	12 (37.5)	20 (62.5)
TM7	12 (1.9)	0 (0.0)	12 (100.0)
<i>Synergistetes</i>	10 (1.6)	2 (20.0)	8 (80.0)
<i>Chlamydiae</i>	1 (0.2)	1 (100.0)	0 (0.0)
<i>Chloroflexi</i>	1 (0.2)	0 (0.0)	1 (100.0)
SR1	1 (0.2)	0 (0.0)	1 (100.0)
<i>Archaea</i>			
<i>Euryarchaeota</i>	1 (0.2)	1 (100.0)	0 (0.0)
Total	619 (100)	293 (47.3)	326 (52.7)

※The contents of this table are from the data suggested by Dewhirst and his co-authors (Dewhirst et al., 2010).

※The number of data for each phylum of human oral microbiom is shown. Total number of data is 619.

1.4 연구의 필요성 (Necessity of the Research)

치주 질환은 치아우식증과 함께 2대 구강질환에 속하며, 높은 유병률을 갖는 한국인의 대표적인 만성질환이다. 치주 질환에 이환되면 저작이 곤란해지고 소화에 지장을 주어 삶의 질을 저하시키는 등의 영향을 미치며, 고혈압, 고지혈증, 뇌졸중, 심근경색, 협심증, 당뇨 등 만성질환의 발생 위험률을 증가시킴으로써 사회, 경제적으로 의료비 증가 및 생산적인 측면에서도 문제를 일으킬 수 있다 (Chun, 2011). 치주 질환은 치태 및 치주낭에 존재하는 치주 질환 원인균들에 존재하는 병독성 인자들의 작용에 의해 치주조직이 파괴됨으로써 발생한다(Haffajee & Socransky, 1994). 치주 질환에 관여하는 미생물들을 연구하는 이유는 크게 두 가지를 들 수 있다. 먼저 병원체에 대한 지식은 질병의 유병률 조사에 대한 수단이 될 수 있다. 이는 특정 미생물에 대한 백신과 같이 그 질환이 발병하기 이전에 병원균을 먼저 감지하고 이를 제거함으로써 질병을 예방할 수 있다는 것이다. 또 치주 질환의 병인적 요소에 대한 지식은 그 질환에 대한 가장 적절한 치료 방법을 선택하는데 도움을 줄 수 있다. 만약 치주 질환의 완벽한 치료방법이 존재한다면, 병인적 요소를 알기위한 실험연구는 필요 없을 것이다. 그러나 아직 적절한 치료방법이 없는 환자들이 있기 때문에 더 정확한 진단과 치료계획이 필요하다 할 것이다.

지금까지 밝혀진 구강 미생물들은 총 600여종에 달하며(Aas et al., 2005), 치주 질환자의 구강 내에서는 약 200여종의 미생물이 검출되었다. 이중에서 치주 질환 원인균으로 밝혀진 종은 약 10여종에 불과하다(Loomer, 2004). 현재 국내외 연구에서는 유전자 마커를 이용한 구강 미생물의 분류가 주로 수행되고 있다. Mager 등은 구강 내 상피에 존재하는 구강 미생물들을 찾아 분류하였고(Mager et al.,

2003), Aas 등은 치아우식증(dental caries), 치주 질환을 비롯한 구강 질환이 없고, 전신적으로도 건강한 집단을 대상으로 그들의 구강 내에 상주하는 정상 세균총(microflora)을 찾아 분류하였다(Aas et al., 2005). Dewhirst 등은 구강 내 존재하는 모든 구강 미생물들을 찾아 분류하고 데이터베이스를 구축하였다(Dewhirst et al., 2010). 그러나 치주 질환 원인균의 유전자를 통합한 데이터베이스는 부재한 실정이다.

인간의 구강건강은 병원균을 비롯한 수많은 요인들에 의해 영향을 받는다. 따라서 구강건강을 향상시키기 위해 구강질환을 일으키는 원인을 명확히 밝히고, 이를 치료하기 위한 정확하고 효과적인 치료방법에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

1.5 연구 목적 (Purpose of Research)

치주 질환 원인균을 비롯한 구강 미생물의 유전정보, 분류체계 정보 및 보건학적 데이터의 구축은 보건 분야의 연구뿐만 아니라 구강 미생물의 계통분류 연구의 기반이 될 것이다. 특히 향후 치주 질환에 대한 정확한 진단 및 효과적인 치료, 치주 질환을 일으키는 다양한 원인균의 분류 및 지속적인 데이터의 보존 및 관리에 이용될 수 있을 것이다. 즉, 본 연구에서는 구강 내에 존재하는 모든 구강 미생물들의 유전자 정보를 통합한 데이터베이스를 구축하고, 유전자 마커로써 치주질환 원인균에 존재하면서 숙주의 치주조직을 파괴하는 병독성 인자들을 이용하여, 데이터베이스에 속한 종들 사이의 유전적 유사성의 정도를 비교하고자 하였다.

본 데이터베이스는 치주 질환 원인균에 있는 병독성 인자들과 모든 구강 미생물의 유전자 서열 데이터를 통합하여 기존에 치주 질환과의 연관성이 불확실하던 종들 사이에서 임상적으로 정확한 치주 질환 원인균을 찾아내어 그에 대한 정보를 제공하는데 일차적인 목적이 있다. 그리하여 데이터베이스로부터 모은 치주 질환 원인균에 있는 병독성 인자들의 유전자 마커 서열을 바탕으로 상동성 비교 및 검색이 가능하도록 함으로써 유전자 서열에 기반하여 해당 병독성 인자를 갖는 구강 미생물들의 분류체계를 확인할 수 있다. 따라서 새롭게 치주 질환 원인균으로 추정되는 종의 발견 시 짧은 유전자 서열만으로도 임상적으로 정확한 치주 질환 원인균의 동정이 가능하도록 하였다. 완성된 데이터베이스는 이를 사용하는 연구자가 데이터를 쉽게 얻을 수 있을 뿐만 아니라 2차 연구에 이용할 수 있도록 웹상에 공개함으로써 치주 질환 원인균의 유전자 서열을 쉽게 얻을 수 있는 웹 공간 제공과 쿼리 유전자 서열로 치주 질환 원인균 동정을 할 수 있는 데이터베이스 구현에 그 목적이

있으며, 보건학적 데이터인 치주 질환의 원인균 및 그들의 병독성 인자에 대한 정보를 포함하여 향후 치주질환을 비롯한 구강질환을 일으키는 병원균에 대한 연구의 바탕이 되고자 한다.

제 2 장. 연 구 방 법

(MATERIALS & METHODS)

2.1 데이터 수집 및 가공

(Data Collection & Processing)

본 연구에서 이용된 구강 미생물들과 치주 질환 원인균의 병독성 인자들에 대한 데이터는 GenBank (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank/>)에서 수집하였다. GenBank의 ftp 사이트에는 모든 종의 서열이 데이터로 구축되어 저장되어 있는데, 구강 미생물과 유전자 마커로 사용할 치주 질환 원인균의 병독성 인자들에 대한 데이터는 gb파일명으로 되어 있다. 찾아낸 데이터들 중에서 데이터베이스 구축에 필요한 정보만 추출하기 위해 JAVA 프로그래밍 언어를 이용하여 데이터 파싱과정을 수행하였다.

flat 파일 내의 ‘ACCESSION’ 행에서 서열의 고유번호와 ‘SOURCE’ 행에서 종의 이름, ‘ORGANISM’ 행에서 종이 속한 계통 분류학적 정보, ‘ORIGIN’ 행에서 서열 정보만을 추출하였다. 이러한 데이터의 수집과정을 통해 BLAST에 기반이 되는 데이터베이스를 fasta 형식으로 재가공하기 위해 각 서열마다 ‘>’ 표시를 시작으로 종 이름과 분류체계, Accession 넘버가 한 행 안에 모두 포함되게 한 후 아래 행에 유전자 서열의 공백을 제거한 후 대문자로 바꾸어 한 줄에 70개씩 유전자 서열이 나열되도록 하였다. Figure 2.1은 본 연구를 수행하기 위해 Genbank로부터 찾아 저장한 데이터 파일이며, Figure 2.2는 Genbank로부터 찾아 저장한 데이터 파일을 바탕으로 데이터 가공 후 형성된 데이터 형식을 나타내었다.

```

LOCUS      AB034201                1497 bp    DNA        linear    BCT 10-FEB-2001
DEFINITION Erysipelothrix tonsillarum gene for 16S rRNA, partial sequence.
ACCESSION  AB034201
VERSION    AB034201.1  GI:7678893
KEYWORDS   16S ribosomal RNA.
SOURCE     Erysipelothrix tonsillarum
  ORGANISM Erysipelothrix tonsillarum
            Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales;
            Erysipelotrichaceae; Erysipelothrix.
REFERENCE  1
  AUTHORS  Kiuchi,A., Hara,M., Pham,H.S., Takikawa,K. and Tabuchi,K.
  TITLE    Phylogenetic analysis of the Erysipelothrix rhusiopathiae and
            Erysipelothrix tonsillarum based upon 16S rRNA
  JOURNAL  DNA Seq. 11 (3-4), 257-260 (2000)
  PUBMED   11092736
REFERENCE  2 (bases 1 to 1497)
  AUTHORS  Kiuchi,A.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (28-OCT-1999) Akio Kiuchi, Asabu University, School of
            Veterinary Medicine; Fuchinobe 1-17-71, Sagamihara, Kanagawa
            229-8501, Japan (E-mail:kiuchi@asabu-u.ac.jp, Tel:81-42-754-7476,
            Fax:81-42-754-7477)

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..1497
                       /organism="Erysipelothrix tonsillarum"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /db_xref="taxon:38402"
     rRNA              <1..>1497
                       /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN
1  agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcggtgc ctaatacatg caagtcgaac
61  gaagtgaaga ggagcttgct ccttggaact tagtggcgaa cggttgagta atacataagc
121  aacctgcctc gatgcctggg ataacagagg gaaactctcg ctaataccgg atacgttaat
181  ctaagacatc ttagattaat taagatggg atacatcaca acgagatggg cttatggcgc
241  attagttagt tggtaaggta acggcttacc aagacgatga tgcgtagccg acctgagagg
301  gtgaccggcc aactggggac tgagacacgg ccagactccc tacgggaggg agcagtaggg
361  aattttcggc aatgggggaa accctgacgg agcaacggcg cgtgagtga gacggcctta
421  ggggtgtaaa gctctgttgt aagggaagaa caataagaag agggaaatgct tcttatatga
481  cggtacctta ccagaaagcc acggctaaat acgtgccagg agccgcggta atacgtaggt
541  ggcaagcggt atccgggaat attgggcgta aagggaagcg aggcggttta tcaagtatat
601  ggttaaagtt cggggcttaa ccccgtagtg ccatagaaac tggtagacta gagtgcagga
661  gaggttagtg gaattccatg tgtagcggta aaatgcgtag atatatggag gaacaccagt
721  ggcgaaggcg gctaactggc ctgttaactg cgtcgaggct cgaagcgtg gggagcaaat
781  aggattagat accctagtag tccacggcgt aaacgatgga tactaagttg tggagaaatt
841  cagtgtctga gttaacgcaa taagtatccc gccctggggg tatgcgcgca agcgtaaaaa
901  tcaaaagaaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagtat gtgttttaat tcgaagcaac
961  gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatacc gcgcaaaagc acagagatgt gtaatatgta
1021  tggcggatag aggtgggtgca tgggtgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt
1081  cccgcacaga gcgcacccct tgtctttagt taccagcatt aagttgggga ctctaaagag
1141  actgcccgtg ataaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga
1201  tctgggctac caactacta caatggcgta tacagagggc agcgaagcag cgtatggcgg
1261  cgaatctcag aaagtacgtc tcagttcgga ttggagctcg caactcgact ccatgaagtc
1321  ggaatcgcta gtaatcgcg atcagaatgc cgcggtgaat acgttctcgg gccctgtaca
1381  caccgcccgt caaaccatga gagtgggtaa tacccgaagc cggtggccta acctagttta
1441  ctaggagggg gccgtcgaag gtaggatcga tgattggggt taagtctgaa caaggtta

```

Figure 2.1 Genbank data before processing. It is a form of initial data obtained from the Genbank before carrying out this study. Gene sequences contain various kind of information.

a)

```
>gi|74145426|gb|DQ174269.1| Achromobacter xylosoxidans 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AGTTTATCTCTGGCTCAGATTGAACGCTAGCGGGATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCAGCGAC
TTCCGCTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGTATCGGAACGTGCCAGTAGCGGGGGATAACTA
CGCGAAAGCGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCACTATT
GGAGCGCGCATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAACGGCTACCAAGCGCAGCATCCGTAGCTGGTT
TGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCACTGGGGAAT
TTTGACAAATGGGGGAAACCTGATCCAGCCATCCCGCGTGTGCGATGAAGGCCTCGGGTTGTAAGCA
CTTTTGGCAGGAAAGAAACGTGCGGGGTTAATACCTCGCGAACTGACGGTACCTGCAGATAAGCACCG
GCTAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAG
CGTGCGCAGCGGTTTCGGAAGAAAGATGTAAATCCAGAGCTTAACCTTGGAACTGCATTTTAACTA
CCGGGCTAGAGTGTGTCAGAGGAGGTGGAATCCCGCTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATCGCGGAGGA
ACACCGATGCGCGAGGCAGCCTCTGGGATAACACTGACGCTCATGCACGAAAGCCTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCTCGTGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGGCCTTCGGGCCTTGGTAG
CGCAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGG
GGACCCGCAACGCGGTGGATGATGTGGAATTAATTCGATGCAACGCGGAAACCTTACCTACCCCTTGACA
TGCTCTGGAATGCCAGAGAGATTGGCAGTCTCGCAGAGAACCGGAAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGC
TCAGCTCTGCTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTGATAGTTGCTACGAA
AGGGCAGCTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGGAAGTGGGGATGACGCTCAAGTCTCTATGGCCC
TTATGGGTAGGGCTTCACAGCTCATCAATGGTCGGGACAGAGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAA
TCCACAGAAACCCGATCGCTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTCGGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAA
TCGCGGATCAGCATGTCCGGTGAATACGTTCCCGGCTCTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGT
GGGTTTTACAGAGTAGTTAGCCTAACCGCAAGGGGGGGATTACCACGGTAGGATTATCATGCTGGGGT
GAAGTCGTACAAAGTAAC
↓
>gi|829087|emb|X81660.1| A.baumannii 16S rRNA gene (DSM30007)
AACCGTGGCGGAGCGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACCGGACCTTAGCGGCG
GACCGGTTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACACATCTCGAAAGGGATGCTAATACCG
CATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAG
CTAGTTGGTGGGTAAGGGCTTACCAAGCGCAGCATCTGTAGCGGCTGAGGAGGTATCCGCCACACT
GGGACTGAGACACGCGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAACCCCT
GATCCAGCCATGCCCGGTGTGTAAGAAAGGCCTTATGGTGTAAAGCACTTAAAGCAGGAGGAGGCTAC
TTTATGTTAATACCTAGAGATAGTGACGTTACTCGCAGATAAGCACCGGCTAATCTGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACAGAGGGTCCGAGCGTTAATCGGATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGCGGGCTTATTTAA
```

b)

```
U41352 Capnocytophaga sp Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga TAACGATGAAGAG
AF538853 Capnocytophaga sp oral strain P4G_35 P4 Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnoc
M35014 Cardiobacterium hominis Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Cardiobacteriales Cardiobacteriaceae Cardiobacterium
AF144697 Cardiobacterium sp A Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Cardiobacteriales Cardiobacteriaceae Cardiobacterium A
AF144696 Cardiobacterium sp B Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Cardiobacteriales Cardiobacteriaceae Cardiobacterium G
AF385556 Catonella sp oral clone BR063 Bacteria Firmicutes Clostridia Clostridiales Lachnospiraceae Catonella environmental samp
AY008314 Actinomyces sp oral clone EP005 Bacteria Actinobacteria Actinobacteridae Actinomycetales Actinomycineae Actinomycetacea
AY349369 Catonella sp oral clone FL037 Bacteria Firmicutes Clostridia Clostridiales Lachnospiraceae Catonella environmental samp
X87151 Catonella morbi ATCC 51271 Bacteria Firmicutes Clostridia Clostridiales Lachnospiraceae Catonella TGAACGCTGGCGCGTGCCTA
DQ493433 soil bacterium TWE165 Bacteria Proteobacteria Alphaproteobacteria AGAGTTTGATCTGGCTCAGAGCGAAGCGTGGCGGAGGCTTAACACATGC
D89883 Centipeda periodontii DSM 2778 Bacteria Firmicutes Negativicutes Selenomonadales Veillonellaceae Centipeda TTTTAGAGATT
L06108 Chlamydia pneumoniae Bacteria Chlamydiae Chlamydiales Chlamydiaceae Chlamydia/Chlamydia group Chlamydia TTTTCTGAGATT
AY331414 Chloroflexi genomsp P1 Bacteria Chloroflexi GARAACCGTGGCGGCTGTATATACATGCAATGCAACCGGTCAGAGCATGACAGTGGCGAACCGGTGA
AF385563 Eubacterium sp oral clone BR014 Bacteria Firmicutes Clostridia Clostridiales Eubacteriales Eubacterium environmental s
GG422712 Clostridiales bacterium oral taxon 093 Bacteria Firmicutes Clostridia Clostridiales GAGTTTGATCTGGCTCAGAGCGAAGCGTGGCGG
AF481208 Clostridiales bacterium oral clone MCE3_9 Bacteria Firmicutes Clostridia Clostridiales environmental samples. GATGAAC
AY207065 Clostridiales bacterium oral clone P4PA_66 P1 Bacteria Firmicutes Clostridia Clostridiales environmental samples. GAC
AY008316 Actinomyces sp oral clone EP053 Bacteria Actinobacteria Actinobacteridae Actinomycetales Actinomycineae Actinomycetacea
AF538854 Clostridiales bacterium oral clone P4PB_122 P3 Bacteria Firmicutes Clostridia Clostridiales environmental samples. GAT
AF287779 Firmicutes oral clone F058 Bacteria environmental samples GGATAACNCTGGCGGTACATAGACATGCAAGTCGACGGGAGAGAGAGATT
AF287755 Corynebacterium sp oral clone AK153 Bacteria Actinobacteria Actinobacteridae Actinomycetales Corynebacterineae Coryneb
EF442428 Corynebacterium diphtheriae Bacteria Actinobacteria Actinobacteridae Actinomycetales Corynebacterineae Corynebacteriaceae
Z97069 Corynebacterium durum Bacteria Actinobacteria Actinobacteridae Actinomycetales Corynebacterineae Corynebacteriaceae Coryn
X82065 Corynebacterium matruchotii Bacteria Actinobacteria Actinobacteridae Actinomycetales Corynebacterineae Corynebacteriaceae
```

Figure 2.2 Genbank data after processing using Java script. Genbank data are changed using java scripts a) fasta format for standalone BLAST b) sql format for table which has information of species classification.

2.2 시스템 개발 환경 및 BLAST 서버 구축 (Development of System Environment & Construction of BLAST Server)

HPC 클러스터 시스템을 기반으로 ‘8C AMD Opteron-6128’ 2.0Ghz, ‘8Gb RAM’, ‘500Gb SATA 8200rpm 3Gbps HDD’ 사양의 서버를 구축하였다. ‘Operating System’으로는 ‘Linux v2.6.18’을 사용하였으며 리눅스 서버 환경에서 데이터 저장을 위하여 MySQL을 이용하였다. 또한 데이터 파싱을 위해 JAVA 프로그래밍 언어와 웹과의 연동을 위한 프로그래밍 언어로는 JSP, HTML 그리고 JAVA 스크립트를 이용하였다. 웹 서버 프로그램으로는 Apache를 기반으로 하였으며 웹 컨테이너로는 ‘Tomcat v7.0.52’를 이용하여 데이터베이스 구축 기반을 마련하였다. Table 2.1에 본 연구를 수행하기 위한 시스템 개발 환경을 요약하였다. 또 웹 인터페이스 BLAST 서버 구축을 위하여 NCBI의 WebBLAST 패키지 ‘`wwwblast(ncbi-blast-2.2.26, for linux)`’를 설치하였다. BLAST에 연동되는 데이터베이스는 앞에서 유전자 서열을 재가공하여 fasta 형식으로 만든 각각의 유전자 서열을 기반으로 하였다. 사용자는 비교하고 싶은 유전자 데이터베이스를 선택하고 쿼리 서열을 입력하게 되면 bit-score 와 e-value를 계산하여 상동성이 높은 상위 100개의 종에 대해 Accession 넘버와 그 종이 포함된 구강 미생물의 분류체계 결과를 볼 수 있도록 하였다. 그리고 쿼리서열(query sequence)과 데이터베이스에 존재하는 21개의 유전자 마커와의 서열을 비교하기 위해 ‘blast 2 sequences program’을 install 하여 ‘pair wise alignment’가 가능하도록 하였다.

Table 2.1 System development enviroment.

Category	System development environment
System	HPC cluster system
CPU	Master node(24 core), 10 compute node (1 for 8core)
Memory	Master node(16GB), 10 compute node (1 for 8GB)
Operation system	Linux
Web server	Apache
DBMS	MySQL
Programming language	JSP, HTML, JAVA

※Using the Apache Web server on the Linux operating system, the foundation for building a database, database management system, Mysql, programming language are based on JSP, HTML, and JAVA respectively.

2.3 데이터베이스 구현 (Implementation of the database)

데이터베이스의 구현은 이를 사용하는 연구자가 데이터를 쉽게 얻을 수 있을 뿐만 아니라 2차 연구에 이용될 수 있는 웹 공간을 제공하도록 설치해야 한다. 이를 위해 데이터베이스의 구현과정은 매우 중요하다. 본 연구에서는 치주 질환 원인균의 유전자 서열을 쉽게 얻을 수 있는 웹 공간 제공과 쿼리 유전자 서열로 치주 질환 원인균 동정을 할 수 있는 데이터베이스 구현에 그 목적이 있다. 데이터베이스에는 21개의 마커 유전자 서열을 검색할 수 있다. 각각의 마커 유전자를 선택하면 테이블이 출력되는데 테이블에는 ‘Accession number’와 치주 질환 원인균의 종의 이름, 계통 분류학적 정보가 포함되어 있다. 여기에서 원하는 유전자 서열을 확인하려면 ‘Accession number’ 선택을 통해 fasta 형식의 내용을 새 창으로 확인할 수 있다. 뿐만 아니라 각 유전자 마커를 선택하면 분류에 이용 가능한 종 정보가 출력되고 선택한 유전자 서열을 포함하는 종들의 유전자 서열을 얻을 수 있도록 하였다. Table 2.2에서는 본 연구에서 이용된 데이터들이 데이터베이스 내의 테이블에 어떠한 형태로 저장되었는지 각 테이블 명과 테이블에 따른 필드 명, 데이터 타입을 나타내었다. 테이블에 저장되어있는 데이터는 모두 문자형이며 종 이름, Accession 넘버는 Varchar 데이터 타입으로 저장하였으며 분류 체계 정보와 길이가 매우 긴 유전자 서열 정보는 더욱 많은 문자형 데이터를 저장할 수 있는 Text 타입으로 설정하였다.

본 데이터베이스의 구현은 크게 세 가지로 나누어지게 되는데 첫 번째는 사람의 구강 미생물의 계통 분류학적 정보 제공이다. 이들 구강 미생물들은 크게 12개의 Phylum(문)으로 나뉘게 되는데 각각의 종마다 형태학적 특징에 유전학적 특징을 추가하여 종의 분

류체계를 가지게 된다. 이러한 분류체계는 현재까지도 이용되고 있지만 더욱 신뢰도 있는 정보의 요구에 따라 분류 방법이 차츰 변화하고 있다. 따라서 유전자 서열에 기반한 정확한 분류체계 마련을 통해 과거의 형태학적 특징으로 분류되었던 구강 미생물의 계통분류 체계를 재정립 할 수 있을 것이다. 두 번째로는 BLAST를 이용한 주요 치주 질환 원인균에 있는 병독성 인자들을 이용한 치주 질환 원인균의 동정 및 서열 기반 상동성 비교에 있다. BLAST로 연동되는 웹 기반에서 유전자 마커로 사용된 각 병독성 인자 별로 데이터베이스가 구축되어 있다. 사용자가 상동성 검색을 시행하고자 하는 데이터베이스를 선택한 후 쿼리 서열을 넣으면 상동성이 높은 종의 분류정보가 나와 유전자 서열에 기반하여 해당 병독성 인자를 갖는 구강 미생물들의 분류체계를 확인할 수 있다. 이는 새로운 치주 질환 원인균의 발견 시 짧은 유전자 서열만으로도 임상적으로 정확한 치주 질환 원인균의 동정이 가능하도록 한 것이다. 완성된 데이터베이스는 <http://lcbb.snu.ac.kr/ppvf/>에 공개되어 있다.

Table 2.2 Schema of the database. PPVF constructed table among the marker genes that are string type.

a)

Name of field each table	Type of data
Acession	accession, Varchar(100)
Species	species, Varchar(100)
Organism	organism, Text(1000)
Origin	origin, Text(10000)

b)

Name of table	Name of gene
Arginine-specific cysteine proteinase	Arg-gingipain
Cytolethal distending toxin	CDT
Collagenase	Col
Capsula polysaccharide synthesis	Cps
Accessory fimbriae	Fim
FimA gene	fimA
Hemolysin erythrocyte lysis protein	HEL
karilysin protease gene	KRP
Lys-gingipain gene (Kgp gene)	Kgp
Leukotoxin	LKT
Immunosuppressive protein gene (fipA gene)	fipA
Arginine-specific cysteine proteinase (RGP-2 gene)	RGP-2
Arg-gingipain-1 proteinase gene	Rgp1
Putative protease (RhAA1)	RhAA1
Cell detaching factor gene	fdF
Elastase precursor gene	gep
gppX gene for gingipain regulator	gppX1
gppX gene for GppX	gppX2
DNA gyrase subunit B gene	gyrB
mfa1 gene	mfa1
mfa2 gene	mfa2
Hemagglutinin gene	phg
portH protease	portH

2.4 데이터베이스 분석 항목 (Items of Database Analysis)

본 데이터베이스는 치주 질환 원인균에 있는 병독성 인자들과 모든 구강미생물의 유전자 서열 데이터를 통합하여 기존에 치주 질환과의 연관성이 불확실하던 종들 사이에서 임상적으로 정확한 치주 질환 원인균을 찾아내어 그에 대한 정보를 제공하는데 목적이 있다. 그리하여 데이터베이스로부터 모은 치주 질환 원인균에 있는 병독성 인자들의 유전자 마커 서열을 바탕으로 상동성 비교 및 검색이 가능하도록 하였다. 데이터로 구축되어 있는 유전자는 지금까지 밝혀진 치주 질환 원인균에 있는 병독성 인자 중 치주조직을 파괴하는 인자들을 대상으로 하였으며, Table 2.3는 본 연구에 사용된 병독성 인자들과 그들을 갖는 치주 질환 원인균의 종을 나타내었다. 유전자 서열 데이터는 얻고자 하는 유전자를 선택하면 종의 계통 분류학적 정보와 함께 얻을 수 있다. 또한 치주 질환 원인균의 동정 시 서열 비교가 가능하도록 ‘Pair-wise Alignment’를 데이터베이스에서 바로 이용할 수 있도록 하였다. 뿐만 아니라 각각의 유전자 서열을 BLAST에서 독립적으로 상동성 검색을 시행할 수 있도록 데이터베이스화 하여 쿼리 서열을 입력하면 상동성이 높은 상위 100개의 종에 대한 유전자 서열과 종의 계통 분류학적 정보를 함께 얻을 수 있다. BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)은 상동성을 이용한 유전자 검색법이다. 이는 NCBI에서 제공하는 데이터베이스를 기반으로 검색을 수행할 수 있으며 독자적으로 구축된 데이터베이스에서 ‘Standalone BLAST’ 서버 구축을 통해서도 상동성 검색을 할 수 있다는 것을 의미한다. 본 데이터베이스에서도 독자적인 데이터베이스 구축과 함께 BLAST 서버를 구축하여 치주 질환 원인균의 병독성 인자들로만 구성된 데이터베이스 안에서 유전자 서열의 상동성

검색을 수행할 수 있도록 하였다. ‘Pair-wise Alignment’는 서열 정렬을 통하여 서열의 상동성 분석을 수행할 수 있다. 서열 정렬을 위한 소프트웨어 프로그램은 ClustalX, ClustalW, MUSCLE, MAFFT, SAM과 PSAlign 등의 바이오인포매틱스를 기반으로 한 프로그램이 있으며 본 연구에서는 ClustalX를 이용하였다. 그리고 서열 정렬 결과를 바탕으로 Multigene으로 연결시켜주는 소프트웨어는 ‘SequenceMatrix1.7.8’을 바탕으로 하였으며 계통수를 작성할 수 있는 컴퓨터 프로그램은 PAUP, Phylip, TreeView, MEGA, TreeMap, 그리고 Phylotools 등이 있는데 이 중 MEGA를 이용하여 계통수를 작성하였다.

Table 2.3 The species of periodontal pathogen and their virulence factors used in this study as genetic marker.

Species of Periodontal pathogen	Virulence factors
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Cytolethal distending toxin Leukotoxin Putative protease (RhAA1)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Arginine-specific cysteine proteinase Collagenase Capsular polysaccharide synthesis gene Accessory fimbriae gene (fimC, fimD, fimE) fimA gene Lys-gingipain gene(Kgp gene) Arginine-specific cysteine proteinase (RGP-2 gene) gppX gene for gingipain regulator fimbrillin Mfa1 fimbriae associated protein
<i>Prevotella intermedia</i>	Hemolysin erythrocyte lysis protein Elastase precursor gene Hemagglutinin gene
<i>Tannerella forsythia</i>	portH protease gppX gene for GppX Cell detaching factor gene
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	karilysin protease gene Immunosuppressive protein gene (fipA gene)

2.5 계통수 작성과 정확도 측정 (Construction of Phylogenetic Tree & Accuracy Measurement)

본 연구에서는 구축한 검색시스템을 기반으로 유전자 마커로써 치주 질환 원인균에 있는 병독성 인자를 이용하여 동일한 병독성 인자를 갖고 있는 구강 미생물들 간의 관계를 확인할 수 있도록 계통수(Phylogenetic tree)를 작성하였다. 계통수는 생물학에서의 진화적 관계를 이해하고 나타내기 위한 방법으로, 진화적 흐름에서 발생하는 중요한 정보들을 요약해서 내포하고 있다. 계통수를 작성하기 위한 다양한 방법들은 구성되는 형태에 따라 크게 ‘rooted tree’와 ‘unrooted tree’의 두 가지로 나뉘게 된다. ‘Rooted tree’에는 공통조상이 존재하고, 이로부터 관련 있는 종들의 분기점 및 분지 정보 등을 통해 진화적 방향과 관계를 나타내는 반면, ‘unrooted tree’는 공통조상 없이 분류군들 사이의 진화적 관계를 나타낸 것으로, 진화의 방향이 고려되지 않는다. 그러나 ‘unrooted tree’에서 계통수를 구성하는 개체들과 구분되는 외집단을 설정하면, ‘rooted tree’를 구성할 수 있다(Zvelebil et al., 2008).

데이터를 구성하는 방법으로는 데이터 간의 유사한 정도를 이용하는 ‘Distance based method’와 ‘Character based method’가 있다. ‘Distance based method’는 종마다 서열 간의 차이를 ‘pairwise distance matrix’ 형태로 나타낸 후, 알고리즘에 따라 계통수를 구성하는 것이다. 각각의 서열 차이에 기반한 이 방법은 서열 간의 돌연변이가 일어날 확률을 계산하지 않았기 때문에 evolution을 설명하지 못하고 taxa간의 차이를 보여준다. 이러한 ‘distance matrix’를 이용한 대표적인 방법으로는 ‘rooted tree’에 기반한 UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)와 ‘unrooted tree’에서 기반한 NJ

(Neighbor-Joining) 기법이 있다. UPGMA 기법은 형태학적인 특성들을 이용하여 진화적 관계를 파악하기 위해 만든 통계적인 방법으로, 가장 가까운 거리에 있는 두 node를 묶어 가면서 그룹을 형성하고 tree를 완성하는 방법이다. NJ 기법은 neighbor 간의 관계에 중점을 두면서 분지들의 전체 길이 합이 최소화가 되도록 계통수를 구성하는 방법이다. 각 단계마다 가능한 모든 neighbor를 대상으로 분지의 길이를 최소화 하는 쌍을 골라 그룹을 이루게 하고, 다시 새로운 ‘distance matrix’를 생성하는 과정이 반복되면서 계통수가 완성된다. 서열 간의 치환 확률을 고려하여 계산한 ‘Character based method’는 evolution을 설명할 수 있으며 ML(Maximum Likelihood) 기법과 MP(Maximum Parsimony) 기법이 있다. ML(Maximum Likelihood) 기법은 정렬된 서열에서 관찰되는 모든 종류의 염기치환 확률을 고려하여, 그 총합이 가장 큰 계통수를 선택하는 통계적 방법으로, 이 과정을 통해 선택된 계통수가 계통 발생학적인 관계를 가장 잘 반영한다고 가정한다. MP(Maximum Parsimony) 기법은 의미 있는 서열에서 나타나는 치환을 고려하는 방법으로, 최소의 치환 수를 갖는 계통수가 진화적 관계를 잘 반영한다는 가정 하에 계통수를 구성한다 (Zvelebil et al., 2008).

계통수를 구성하는 다양한 기법들 중에서 본 연구에서는 계통수 구성하기 위해 각 형질에 대해 실제 데이터 양식의 분포를 최적화 하는 분지도를 만들어 내는 ML(Maximum Likelihood) 기법을 사용하였다. 실제로 이 기법은 alignment에서 각 염기서열의 위치에 따라 좌우된다. 이때 우도(Likelihood)는 주어진 특정 tree와 전체적인 염기서열의 빈도에 따라 특정 삽입과정에 의해 제공되는 사이트의 다양한 패턴의 가능성에 의해 계산된다. 따라서 정렬된 서열에서 관찰되는 모든 종류의 염기 치환 확률을 고려하여, 그 총합이 가장 큰 계통수를 선택한다. 이런 과정을 통해 선택된 계통수가 계통 발

생화학적 관계를 가장 잘 반영한다고 가정한다. 알고리즘, 컴퓨터 및 계통 발생학적 이해가 향상됨에 따라 ML 기법은 분자 계통 발생학적 분석에 더 많이 사용되고 있으며, 시뮬레이션 연구에서 data를 생성하는 동일한 모델에 대해 ML의 분석 능력은 지속적으로 MP의 분석 능력보다 뛰어난 결과값을 보여주었다. 한편, ML은 Tree 작성 방법 중 가장 연산 집약적인 방법이지만, 실제와 다른 결과를 보이는 경우도 있다(Brinkman & Leipe, 2001).

본 연구에서는 유전자 마커인 각각의 병독성 인자들을 기반으로 계통수를 작성한 뒤 각 level 마다 얼마나 분류가 잘 되는지 정확도를 측정하기 위하여 아래의 공식을 이용하였다.

$$\text{Accuracy} = \frac{N_g}{T_g - T_u}$$

N_g : The number of grouping species each level

T_g : Total number of grouping species each level

T_u : Total number of ungrouping species each level

또한 계통수 작성시 ‘bootstrap value’를 100으로 지정하였다. 이는 초기 matrix에서 가능한 ‘sample tree’를 100번 조합하여 수행하는 것을 의미한다. 만약 각 node 마다 나타난 수치 값들 중 하나가 90이라면, 이는 100번의 수행 결과 중 90번에서 이와 동일한 결과를 보이는 것을 말한다. 이 값이 100에 가까울수록 계통수의 정확도가 높다고 할 수 있다.

제 3 장. 연 구 결 과 (RESULTS)

3.1 마커 유전자 기반 검색 시스템 구축 (Constrution of Search System based on Marker gene)

본 연구에서는 GenBank(<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank/>)에 구축되어 있는 모든 구강 미생물들의 유전자 및 치주 질환 원인균에 있는 병독성 인자들의 유전자 서열을 통합한 데이터베이스를 구축하고자 하였다. 뿐만 아니라 독자적인 웹 인터페이스 BLAST 서버(server)를 구축함으로써 유전자에 따라 기존에 알려지지 않은 구강 미생물들의 동정이 가능하도록 하였다. 상동성 검색에 기반한 프로그램인 BLAST는 서열의 일치 정도를 수리적으로 계산하여 서열을 바탕으로 한 종의 분류정보를 예측할 수 있다. 본 연구에서 구축한 데이터베이스인 PPVF(Periodontal Pathogen Virulence Factor database)에는 유전자 마커로써 21개의 치주 질환 원인균에 있는 병독성 인자들에 대한 유전자 서열이 저장되어 있어, 이들을 클릭하면 저장되어 있는 데이터들이 테이블로 출력되는데 Accession 넘버와 함께 종 이름, 계통분류 정보(Phylum, Subphylum, Class, Order)가 포함되어 있다. 여기에는 종의 유전자 서열을 얻고자 할 때에는 Accession 넘버를 검색하면 얻고자 하는 유전자 서열을 얻을 수 있으며, 저장되어 있는 데이터는 각 유전자 별로 차이를 보인다. 파싱한 구강 미생물의 유전자 데이터의 전체 개수는 총 653개이며, 구축한 데이터베이스에 속한 구강 미생물의 Phylum(문)에 따른 데이터의 개수는 후벽균문(Firmicutes)이 219개로 가장 많았고, 의간균문(Bacteroidetes)이

118개, 프로테오박테리아문(Proteobacteria)이 108개, 방선균문(Actinobacteria)이 73개, 스피로헤타문(Spirochaetes)이 49개, 푸소박테리움균문(Fusobacteria)이 38개로 이들 여섯 가지의 주요 Phylum(문)들이 전체 구강 미생물 종의 92.6%를 차지하였다. 나머지 Phylum(문)들은 테네리쿠테스문(Tenericutes)이 10개, Candidatus문이 7개, 시네르기스테스균문(Synergistetes)이 2개, 클라미디아균문(Chlamydiae), 녹만균류문(Chloroflexi), SR1이 각 1개씩, 분류되지 않은 종이 1개, 분류되지 않은 시퀀스가 1개, 기타 Candidatus로 분류되지 않은 배양이 불가능한 미생물 군을 비롯한 나머들이 24개로 이들이 총 7.4%를 차지하였다. Table 3.1은 본 연구에서 구축한 데이터베이스에 속한 구강 미생물들의 각 Phylum(문)에 따른 데이터의 개수를 나타낸 것이다.

다음은 구강 내에 존재하는 미생물들 중에서 치주 질환 주요 원인균으로 밝혀진 5개 균에 있는 병독성 인자들의 유전자 서열과 유사한 유전자를 갖는 종이 존재하는지 알아보았다. 유전자 마커로 이용된 병독성 인자들은 모두 16s rRNA로 구성되어 있다. 파싱 결과, 이들 병독성 인자들과 유사한 유전자를 갖는 종들의 데이터 개수는 총 73개이며, 각 인자별 데이터의 수는 Collagenase가 10개로, 가장 많은 수의 종들이 Collagenase와 유사한 유전자를 갖고 있었다. 그 다음으로는 ‘Capsula polysaccharide synthesis gene’과 ‘gppX gene for GppX’가 각 12개씩, ‘Immunosuppressive protein gene (fipA gene)’이 10개, ‘Arginine-specific cysteine proteinase (RGP-2 gene)’, ‘DNA gyrase subunit B gene’, ‘Putative protease (RhAA1)’이 각 8개씩, ‘Lys-gingipain gene (Kgp gene)’, ‘Hemagglutinin gene’이 각 7개씩, ‘gppX gene for gingipain regulator’이 5개, ‘Elastase precursor gene’이 4개, ‘Cytolethal distending toxin’이 3개, Leukotoxin이 2개, ‘mfa1 gene’, ‘mfa2 gene’, ‘Arg-gingipain-1 proteinase gene’, ‘Hemolysin

erythrocyte lysis protein'이 각 1개씩 있었으며, 'Arginine-specific cysteine proteinase', 'Accessory fimbriae', 'FimA gene', 'karilysin protease gene', 'Cell detaching factor gene', 'portH protease'는 각각 데이터 수가 0으로 이들과 유사한 유전자를 갖는 구강미생물이 존재하지 않았다. Table 3.2은 본 연구에서 구축한 데이터베이스에 속한 구강 미생물들 중 유전자 마커로 사용된 병독성 인자 유전자 서열과 유사한 유전자를 갖는 종의 데이터의 개수를 나타내었다.

치주 질환 원인균의 동정 및 분류를 위한 마커 유전자 기반 검색 시스템은 사용자가 웹상에서 이 시스템을 이용할 수 있도록 하기 위해, <http://labb.snu.ac.kr/ppvf>에 웹 공간을 마련하고, 구축한 검색시스템 명을 PPVF라 칭하였다. Figure 3.1은 구축한 검색시스템의 메인페이지로 이 데이터베이스를 구축한 목적과 저장되어있는 데이터 정보 및 데이터베이스의 기능에 대해 명시하였다. PPVF의 주요 기능은 첫 번째, 주요 치주 질환 원인균에 있는 병독성 인자들의 유전자 서열에 대한 정보와 모든 구강 미생물들을 포함한 데이터 정보를 제공한다. 두 번째, 구강 미생물에 대한 BLAST 데이터베이스를 구축하여 서열 정렬 시스템을 제공한다. 마지막으로 두 서열을 정렬할 수 있도록 'Pair-wise Alignment'를 수행할 수 있는 시스템을 제공한다. Figure 3.2는 'ORAL MICROBIAL' 페이지를 선택하였을 때의 결과이다. 좌측의 메뉴에는 데이터베이스에 속한 구강 미생물의 Phylum(문)이 나열되어 있으며, 이중 하나의 Phylum(문)을 선택하면, 해당 Phylum(문)에 속한 구강 미생물 종들의 계통분류학적 정보와 유전자 서열을 확인할 수 있다. Figure 3.3은 'PATHOGEN MARKER' 페이지를 선택하였을 때의 결과이다. 이 페이지에서는 주요 치주 질환 원인균과 이들이 포함하는 병독성 인자들의 종류를 테이블로 나타내었고, 좌측 메뉴에 있는 병독성 인자를 클릭하면 해당 인자의 유전자 서열을 확인할 수 있다.

다음으로 구강 미생물의 쿼리 서열을 입력하여 서열 기반으로 종 동정이 가능하도록 구축한 StandaloneBLAST 시스템 구축 결과이다. 구축한 페이지는 Figure 3.4에 나타내었으며, 각각의 Phylum(문)을 기반으로 데이터베이스를 구축하여, 사용자가 검색하고자 하는 구강 미생물을 Phylum(문) 별로 확인할 수 있다. Figure 3.5는 임의의 쿼리 서열 데이터를 fasta 형식으로 입력하고 BLAST를 실행한 결과이다. 실행 결과 데이터베이스 안에서 상동성 검색을 통해 높은 상동성을 갖는 종의 정보부터 상위 100개의 종 정보와 분류체계, 유전정보를 얻을 수 있다. 더 자세한 상동성 검색을 수행하기 위해 ‘Pair-wise Alignment’ 시스템 구축 페이지와 이를 실행한 결과를 Figure 3.6와 Figure 3.7에 나타내었다.

세균에 속하는 구강 미생물은 형태학적 분류의 한계로, 유전자 서열을 이용한 구강 미생물의 분류의 중요성이 커지고 있다. 이에 따라 본 연구에서 구축한 BLAST와 ‘Pair-wise Alignment’는 구강 미생물의 계통 분류학적 정보와 함께 새로운 구강 미생물의 발견 시 같은 분류체계에 속하는 세균 종들과의 유전자 서열을 비교함으로써 이차 연구를 수행할 수 있는 생명정보학적 틀로써 이용될 수 있을 것이다.

Table 3.1 Amount of sequence data.

Phylum	No.(%) of Taxa
<i>Bacteria</i>	
<i>Firmicutes</i>	219 (33.5)
<i>Bacteroidetes</i>	118 (18.1)
<i>Proteobacteria</i>	108 (16.5)
<i>Actinobacteria</i>	73 (11.2)
<i>Spirochaetes</i>	49 (7.5)
<i>Fusobacteria</i>	38 (5.8)
<i>Tenericutes</i>	10 (1.5)
<i>Candidatus</i>	7 (1.1)
<i>Synergistetes</i>	2 (0.3)
<i>Chlamydiae</i>	1 (0.2)
<i>Chloroflexi</i>	1 (0.2)
SR1	1 (0.2)
Unclassified Bacteria	1 (0.2)
Unclassified Sequence	1 (0.2)
Baterial Deferribacteres enviromental samples	4 (0.6)
Baterial enviromental samples	20 (3.1)
Total	653

※The number and % of data for each phylum of oral microbial is shown. Total number of data is 653.

Table 3.2 Amount of sequence data for genetic marker.

Genetic marker for BLAST database	Number of data
Collagenase	10
Capsula polysaccharide synthesis gene	9
gppX gene for GppX	7
Immunosuppressive protein gene (fipA gene)	4
Arginine-specific cysteine proteinase (RGP-2 gene)	5
Putative protease (RhAA1)	4
Lys-gingipain gene (Kgp gene)	7
Hemagglutinin gene	7
Elastase precursor gene	4
Cytolethal distending toxin	3
Leukotoxin	1
mfa1 gene	1
mfa2 gene	1
Arg-gingipain-1 proteinase gene	1
Hemolysin erythrocyte lysis protein	1
gppX gene for gingipain regulator	0
portH protease	0
Cell detaching factor gene	0
Accessory fimbriae	0
karilysin protease gene	0
FimA gene	0
Total	73

※The number of data for genetic marker is shown. Total number of data is 73.

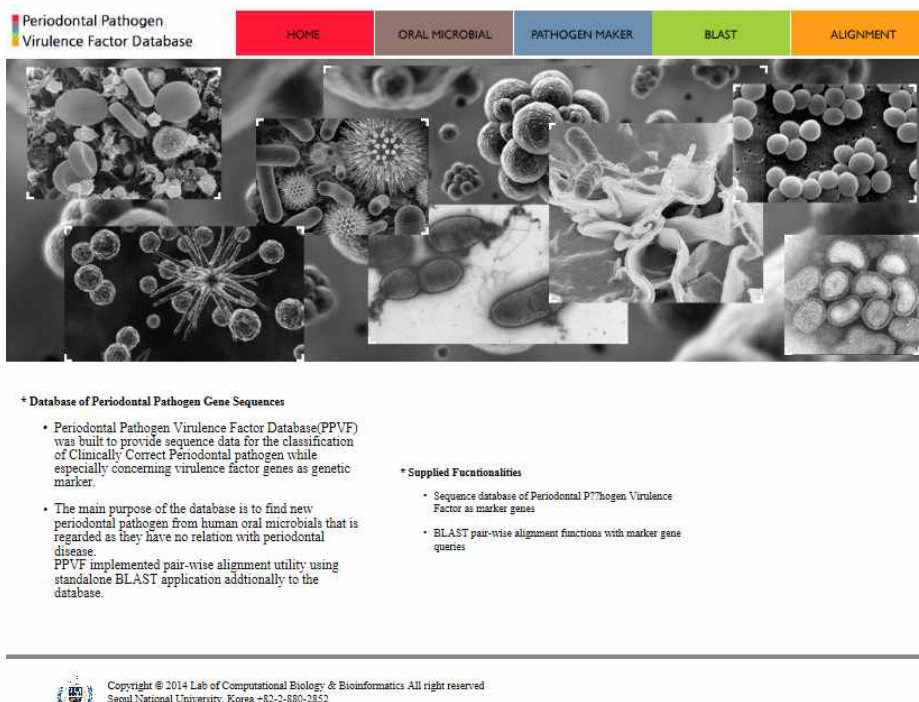


Figure 3.1 Front page of the database. PPVF (<http://labb.snu.ac.kr/ppvf/>) is a database for classification of oral microbial and finding new periodontal pathogen based on virulence factors of periodontal pathogen as genetic markers.

Periodontal Pathogen Virulence Factor Database		HOME	ORAL MICROBIAL	PATHOGEN MAKER	BLAST	ALIGNMENT
---	--	------	----------------	----------------	-------	-----------

ORAL MICROBIAL			
Bacteria			
Firmicutes	ACCESSION	SPECIES	ORGANISM
Bacteroidetes	BD439087	unidentified	unclassified sequences
Proteobacteria	AY278610	Actinomyces genomsp C1	Bacteria Actinobacteria Actinobacteridae Actinomycetales Actinomycineae Actinomycetaceae Actinomyces
Actinobacteria	AY134894	Capnocytophaga sp oral clone BR085	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga environmental samples
Spirochaetes	AF385569	Capnocytophaga sp oral clone BU084	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga environmental samples
Fusobacteria	AF366270	uncultured Capnocytophaga sp	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga environmental samples
Tenericutes	AY008312	Capnocytophaga sp oral clone EL043	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga environmental samples
Candidatus	AY349368	Capnocytophaga sp oral clone ID062	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga environmental samples
Synergistetes	AY005078	Capnocytophaga sp oral clone X066	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga environmental samples
Chlamydiae	AY005080	Capnocytophaga sp oral clone X089	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga environmental samples
SR1	L14639	Capnocytophaga gingivalis	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga
Unclassified	X97248	Capnocytophaga granulosa ATCC 351502	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga
	X97247	Capnocytophaga haemolytica	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga
	AF385504	Actinomyces sp oral clone CT047	Bacteria Actinobacteria Actinobacteridae Actinomycetales Actinomycineae Actinomycetaceae Actinomyces environmental samples
	L14635	Capnocytophaga ochracea	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga
	X67609	Capnocytophaga sputigena ATCC 33612	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga
	AY005077	Capnocytophaga sp oral strain A47ROY	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga
	AY278613	Capnocytophaga genomsp C1	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga
	U41352	Capnocytophaga sp	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga
	AF538853	Capnocytophaga sp oral strain P4G_35 P4	Bacteria Bacteroidetes Flavobacteriia Flavobacteriales Flavobacteriaceae Capnocytophaga
	M35014	Cardiobacterium hominis	Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Cardiobacteriales Cardiobacteriaceae Cardiobacterium
	AF144697	Cardiobacterium sp A	Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Cardiobacteriales Cardiobacteriaceae Cardiobacterium
	AF144696	Cardiobacterium sp B	Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Cardiobacteriales Cardiobacteriaceae Cardiobacterium
	AF385556	Catonella sp oral clone BR063	Bacteria Firmicutes Clostridia Clostridiales Lachnospiraceae Catonella environmental samples

Figure 3.2 Search table of ORAL MICORBIAL menu. The ORAL MICROBIAL menu page shows oral microbials and offers classification information of species and DNA sequences.

Periodontal Pathogen Virulence Factor Database		HOME	ORAL MICROBIAL	PATHOGEN MARKER	BLAST	ALIGNMENT
Virulence Factor						
Collagenase						
Leukotoxin						
Capsule polysaccharide synthesis gene						
gppX gene for GppX						
fapA gene						
RGP-2 gene						
RhAA1						
Kgp gene						
Hemagglutinin gene						
Elastase precursor gene						
Cytolysin distending toxin						
Unclassified						

Species of Periodontal pathogen	Virulence factors
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Cytolysin distending toxin
	Leukotoxin
	Plasmin protease (RhAA1)
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	Arginine-specific cysteine proteinase
	Collagenase
	Capsule polysaccharide synthesis gene
	Accessory fimbriae gene (fimC, fimD, fimE)
	fimA gene
	Lys nuclease gene(Kgp gene)
	Arginine-specific cysteine proteinase (RGP-2 gene)
	gppX gene for gingipain regulator
	fimbriin
	Mfa1 fimbriae associated protein
<i>Prevotella intermedia</i>	Hemolysin erythrocyte lysis protein
	Elastase precursor gene
	Hemagglutinin gene
<i>Tannerella forsythia</i>	porfII protease
	gppX gene & GppX
	Cell detaching factor gene
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	karylysin protease gene
	Immunosuppressive protein gene (fapA gene)

Figure 3.3 Search table of PATHOGEN MARKER menu. The PATHOGEN MARKER menu page shows the virulence factors of major periodontal pathogens and offers DNA sequences.

Periodontal Pathogen
Virulence Factor Database

HOME
ORAL MICROBIAL
PATHOGEN MAKER
BLAST
ALIGNMENT

NCBI
BLAST
BLAST Entrez ?

Choose program to use and database to search:

Program blast Database

Enter sequence below in FASTA

Or load it from disk

Set subsequence: From

Clear sequence Search

The query sequence is filtered

Filter
☒ Low complexity
☐

Expect 10 Matrix BL

Query Genetic Codes (blast)

Database Genetic Codes (tblastx)

Frame shift penalty for blastx: No OOF

Other advanced options:

☒ Graphical Overview
Alignment view Pairwise

Descriptions 100 Alignments 50 Color schema No color schema

Clear sequence Search

Comments and suggestions to: < blast-help@ncbi.nlm.nih.gov >

Last modified: Jan 11, 2002



Copyright © 2014 Lab of Computational Biology & Bioinformatics All right reserved
Seoul National University, Korea +82-2-880-2652

Figure 3.4 Standalone BLAST web interface. Standalone BLAST is constructed based on 25 genetic markers. Users select database for the identification of unknown query sequence.

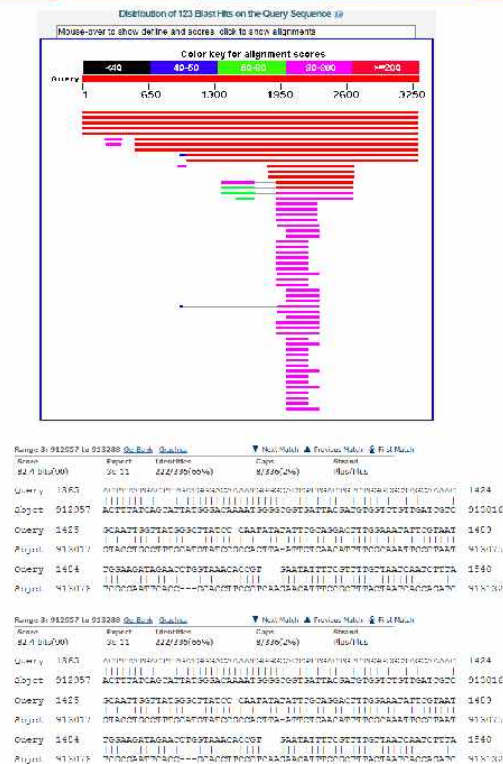


Figure 3.5 Result of species identification using BLAST. Result of input query sequence CDT gene for identification is shown.

Periodontal Pathogen Virulence Factor Database

HOME ORAL MICROBIAL PATHOGEN MAKER BLAST ALIGNMENT

NCBI BLAST 2 sequences [BLAST](#) [Entrez](#) [?](#)

This tool produces the alignment of two given sequences using BLAST engine for local alignment.

Program

Sequence 1: from: to:
 Enter sequence in FASTA format

or download from file

Sequence 2: from: to:
 Enter sequence in FASTA format

or download from file

Parameters used in [BLASTN](#) program only:

Reward for a match: Penalty for a mismatch:

Matrix Open gap and extension gap penalties

Gap x_dropoff Expect value Word size Filter ☒

Comments and suggestions to: blast-help@ncbi.nlm.nih.gov



Copyright © 2014 Lab of Computational Biology & Bioinformatics All right reserved
 Seoul National University, Korea +82-2-860-2852

Figure 3.6 Pair-wise alignment web interface. Pair-wise alignment can be used for detailed result compared to BLAST.

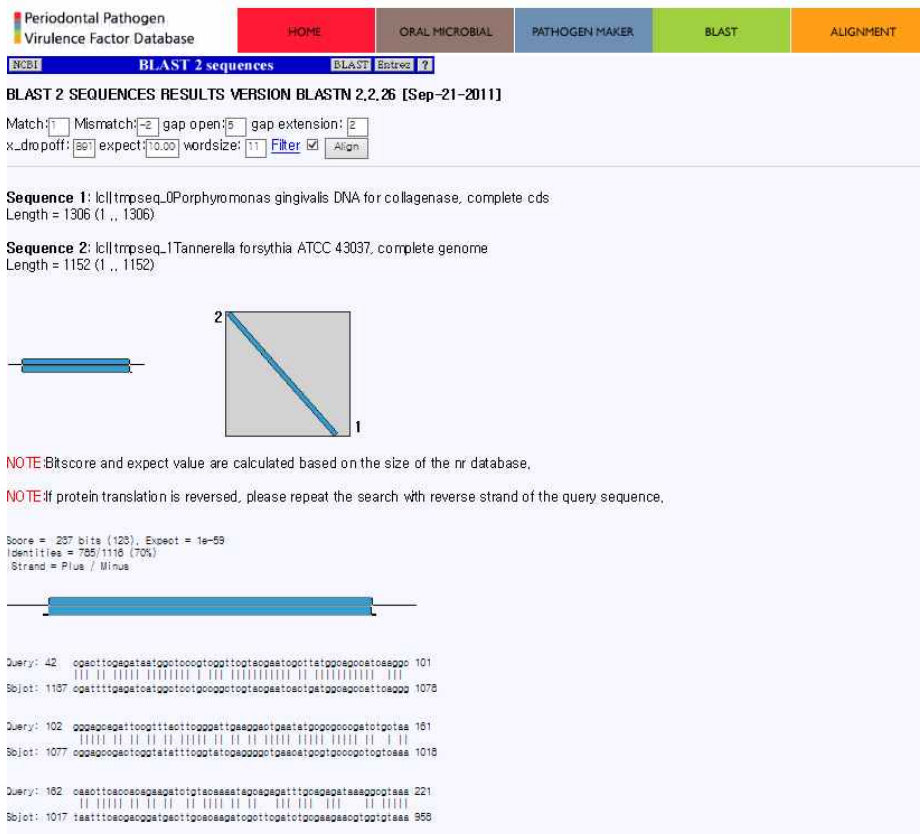


Figure 3.7 Result of pair-wise alignment. The result of pair-wise alignment is shown (Collaganase with *Tannerella forsythia*).

3.2 데이터베이스 기반 치주 질환 유발 추정균 탐색

(Investigation of Potential Periodontal Pathogen based on Database)

사람의 구강에 상주하는 복잡한 세균들은 종의 다양성이 매우 높고, 배양하기 힘들거나 불가능한 세균들이 많기 때문에 세균의 형태학적 분류의 한계로, 유전자 서열을 이용한 구강 미생물의 분류의 중요성이 커지고 있다. 과거에 치주 질환 원인균을 분류하는 기준은 다수의 치주 질환자들의 구강 내에서 채취한 수많은 샘플들에서 공통적으로 검출되는 균들을 모아 그들을 치주 질환을 유발시키는 원인균일 것이라 추정하였다(Christersson et al., 1992). 즉, 지금까지 밝혀진 치주질환 원인균을 비롯한 구강 미생물의 대부분은 서로 다른 사람들의 치주낭에서 채취되어 배양되었고, 이 중에는 구강 내의 한 site 에서만 검출되는 종도 있으며, 배양이 불가능하거나 규명하기 어려운 종도 포함되어있다. 또, 치주질환에 이환된 구강내의 각 site는 서로 다른 병원균에 의해 파괴된 결과로 보는데, 이들은 한가지 원인균에 의해 파괴되었을 수도 있고, 두가지 이상의 병원균이 함께 작용한 결과일 수도 있다. 이 경우, 병인론적으로 한가지 종의 단독 역할을 평가하는 것은 쉽지 않다. 마지막으로, 치주조직이 파괴된 후, 그 결과로 인해 구강내에 존재하던 기회감염균이 증식했을 가능성도 배제할 수 없다. 이들은 치주질환을 유발한 병원균과 공존하며 증식했을 수도 있고, 이 유발균이 감소한 후, 구강내의 환경변화로 인해 증식했을 수도 있기에, 이들을 실험적으로 구분하기는 매우 어려운 일이다(Listgarten et al., 1993; Loomer, 2004). 따라서 그 종이 치주 질환을 일으키는 원인균인지, 아니면 치주 질환 병변에서 이차적으로 집락을 형성하며 서식하는 종인지 확인하

는 연구가 반드시 후행되어야 한다(Lai et al., 1987).

본 연구에서는 구축한 데이터베이스에 속한 구강 미생물들 중에서 치주조직을 파괴하는 병독성 인자들과 유전적으로 유사한 종을 찾음으로써 병독성 인자를 새로운 치주 질환 원인균의 동정 및 분류에 이용할 수 있도록 하였다. 먼저 현재 치주 질환 원인균으로 확정된 5가지 주요 치주 질환 원인균들인 '*P. gingivalis*', '*T. forsythus*', '*P. intermedia*', '*A. actinimycetemcomitans*', '*F. nucleatum*'의 유전적 유사성의 정도를 확인하기 위해 'Pylogenetic Tree'를 작성하고, 더 자세한 상동성 검색을 위해 각각의 균을 짝지어 'Pair-wise Alignment'를 수행하였다. Figure 3.8은 이 5가지 치주 질환 원인균의 유전자 서열 데이터를 fasta 형식으로 입력하고, 'MEGA5.10'(Tamura et al., 2011)을 이용하여 'Pylogenetic Tree'를 'Maximum Likelihood' 방법으로 작성한 결과이다. 먼저 의간균문(Bacteroidetes)에 속한 3종인 '*P. gingivalis*', '*T. forsythus*', '*P. intermedia*'이 하나의 Clade를 이루면서 다른 Phylum에 속한 종들과 분지점을 형성하며 나뉘어졌다. Table 3.3은 더 자세한 상동성 검색을 수행하기 위해 'Pair-wise Alignment' 시스템을 이용하여 각 종 별로 짝지어 Alignment를 수행한 결과이다. '*P. gingivalis*'와 '*T. forsythus*'가 87.84%로 가장 높은 상동성을 보였으며, '*P. intermedia*'와 '*A. actinimycetemcomitans*'가 69.48%로 상동성의 정도가 가장 낮았다.

본 연구에서는 기존에 치주 질환과 관련이 없거나 미약하다고 간주되던 구강 미생물들 중에서 잠재적인 치주 질환 원인균을 찾고자 한다. 따라서 주요 치주 질환 원인균에 존재하는 21개의 병독성 인자들과 본 연구에서 구축한 데이터베이스에 저장되어 있는 구강 미생물들의 유전자 서열 사이의 유전적 유사성의 정도를 비교, 분석하는데 그 기준을 치주 질환 원인균 간의 상동성의 최소치인

69.48%로 정하였다. 그들의 유전적 유사성을 비교한 결과, 데이터의 개수가 0으로 유사한 유전자를 갖는 구강미생물이 존재하지 않은 병독성 인자인 ‘gppX gene for gingipain regulator’, ‘portH protease’, ‘Cell detaching factor gene’, ‘karilysin protease gene’, ‘Accessory fimbriae gene’, ‘FimA gene’과 데이터 개수가 1개로 ‘Pylogenetic Tree’를 작성이 불가능한 Leukotoxin, ‘mfa1 gene’, ‘mfa2 gene’, ‘Hemolysin erythrocyte lysis protein gene’, ‘Arg-gingipain-1 proteinase gene’를 제외한 나머지 10개의 유전자 마커들의 각각과 유사한 유전자를 갖는 구강 미생물들 대상으로 ‘MEGA5.10’(Tamura et al., 2011)을 이용하여 ‘Pylogenetic Tree’를 ‘Maximum Likelihood’ 방법으로 작성하였다. ML방법은 주어진 모델과 가능성 있는 계통수에서 관찰된 자료들 간의 개연성을 확인함으로써 개연성이 가장 높은 계통수를 선택하는 방법이다(Brinkman & Leipe, 2001). 각각의 ‘Pylogenetic Tree’ 작성 결과는 다음과 같다.

Figure3.9는 ‘*Porphyromonas gingivalis*’에 있는 병독성 인자인 ‘Capsular polysaccharide synthesis gene(이하 Cps gene)’과 유전적으로 유사한 구강 미생물들 간의 계통분석을 위해 ML기법으로 작성한 ‘Phylogenetic tree’이다. ‘*Veillonella parvula*’, ‘*Tannerella forsythia*’, ‘*Haemophilus influenzae*’, ‘*Selenomonas sputigena*’, ‘*Escherichia coli*’, ‘*Filifactor alocis*’가 ‘Cps gene’과 유전적으로 유사하였다. ‘Cps gene’과 이들을 각각 ‘Pair-wise alignment’를 수행한 결과 유사성의 정도를 Table3.4에 나타내었다. ‘Cps gene’과의 유사성의 정도가 기준치인 69.48%이상의 값을 나타낸 종은 ‘*Veillonella parvula*’로 81.06% 일치하는 것으로 나타났다. Figure3.10과 Table3.5는 각각 ‘*Porphyromonas gingivalis*’에 있는 병독성 인자인 ‘Collagenase gene’과 유전적으로 유사한 10종의 구강 미생물들의 계통분석을 위해 작성한 ‘Phylogenetic tree’와 그들 간의 ‘Pair-wise alignment’ 결과 상동성의 정도를 수치로

나타낸 결과이다. 이들은 모두 기준치인 69.48% 이하의 값을 보임으로써 치주 질환 원인균으로 추정되는 구강 미생물을 찾을 수 없었다. Figure3.11과 Table3.5은 각각 ‘*Actinobacillus actinomycetemcomitans*’의 병독성 인자인 ‘Putative protease gene(이하 RhAA1 gene)’에 대해 같은 방법으로 작성한 결과이다. ‘RhAA1 gene’과 유전적으로 유사한 구강 미생물 중에는 ‘*Aggregatibacter aphrophilus*’, ‘*Haemophilus parainfluenzae*’, ‘*Escherichia coli*’, ‘*Haemophilus influenzae*’가 있었으며, 이중 ‘*Haemophilus influenzae*’이 ‘RhAA1 gene’과 78.76%의 유전적 유사성을 보임으로써 기준치 이상의 값을 보였다.

Figure3.12과 Table3.7은 각각 ‘*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*’의 병독성 인자인 ‘Cytolethal distending toxin gene sequence(이하 CDT gene)’에 대해 같은 방법으로 작성한 결과이다. ‘CDT gene’과 유전적으로 유사한 구강 미생물 종은 총 3가지이며, 유전적으로 ‘*Haemophilus ducreyi*’가 94.72%, ‘*Aggregatibacter aphrophilus*’가 77.38%, ‘*Helicobacter sp.*’가 72.60% 일치함으로써 이들 모두 기준치 이상의 값을 보였다. Figure3.13과 Table3.8은 각각 ‘*Porphyromonas gingivalis*’의 병독성 인자인 ‘Kgp gene(Lys-gingipain gene)’에 대해 같은 방법으로 작성한 결과이다. ‘Kgp gene’과 유전적으로 유사한 구강 미생물은 총 7종이며, 이 중 ‘*Prevotella dentalis*’가 ‘Kgp gene’과 71.43% 일치하는 것으로 나타났다. Figure3.14와 Table3.9는 각각 ‘*Porphyromonas gingivalis*’의 병독성 인자인 ‘Arginine-specific cysteine proteinase gene(이하 RGP-2 gene)’에 대해 같은 방법으로 작성한 결과이다. ‘RGP-2 gene’과 유전적으로 유사한 구강 미생물 종은 총 5가지이며, 이 중 ‘*Porphyromonas asaccharolytica*’가 ‘RGP-2 gene’과 75.37% 일치하는 것으로 나타났다. ‘*Tannerella forsythia*’의 병독성 인자인 ‘gppX gene’과 동일한 방

법으로 수행한 결과는 Figure3.15와 Table3.10에 나타내었다. 총 7종의 구강 미생물 종이 ‘gppX gene’과 유전적으로 유사한 것으로 보였고, 이 중 ‘*Achromobacter xylosoxidans*’가 89.58%로 ‘gppX gene’과 가장 높은 유사성을 보였다.

Figure 3.16과 Table 3.11은 각각 ‘*Fusobacterium nucleatum*’의 병독성 인자인 ‘fipA gene’에 대해 같은 방법으로 작성한 결과이다. ‘fipA gene’과 유전적으로 유사한 구강 미생물 종은 총 3가지이며, ‘*Fusobacterium nucleatum subsp. animalis*’가 94.10%, ‘*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*’가 90.14%, ‘*Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum*’가 89.58% 일치함으로써 이들 모두 기준치 이상의 값을 보였다. Figure3.17과 Table3.12은 각각 ‘*Prevotella intermedia*’의 병독성 인자인 ‘Hemagglutinin gene’에 대해 같은 방법으로 작성한 결과이다. ‘Hemagglutinin gene’과 유전적으로 유사한 구강 미생물은 총 7종이며, 이 중 ‘*Prevotella melaninogenica*’가 ‘Hemagglutinin gene’과 72.07% 일치하는 것으로 나타났다. 마지막으로 ‘*Prevotella intermedia*’의 병독성 인자인 ‘Elastase precursor gene’에 대해서도 같은 방법으로 수행하였고, 그 결과인 ‘Phylogenetic Tree’와 각 구강 미생물종과의 유전적 유사성의 정도를 Figure3.18과 Table3.13에 나타내었다. ‘Elastase precursor gene’과 유전적으로 유사한 4종의 구강 미생물 중 ‘*Gardnerella vaginalis*’가 85.00% 일치함으로써 기준치 이상의 값을 보였다.

Table 3.3 Percent Identity Matrix of Periodontal pathogens : the result of percent identity matrix of major periodontal pathogen created by Clustal 2.1.

	<i>P.gingivalis</i>	<i>T.forsythus</i>	<i>P.intermedia</i>	<i>A. a</i> ¹	<i>F.nucleatum</i>
<i>P.gingivalis</i>					
<i>T.forsythus</i>	87.84				
<i>P.intermedia</i>	79.34	81.08			
<i>A. a</i>	71.35	71.49	69.48		
<i>F.nucleatum</i>	74.11	72.72	71.55	75.16	

*A.a*¹ means *Aggregatibacter actinomycetes*

Table 3.4 Percent Identity Matrix of Capsular polysaccharide synthesis gene: the result of percent identity matrix of Capsular polysaccharide synthesis gene sequence of *Porphyromonas gingivalis* created by Clustal2.1.

<i>Species</i>	Percent Identity
<i>Veillonella parvula</i>	81.06
<i>Tannerella forsythia</i>	49.71
Uncultured organism clone 1041059766245	39.01
<i>Haemophilus influenzae</i>	28.94
Uncultured organism clone VC1CN80TR	38.66
<i>Selenomonas sputigena</i>	42.52
<i>Escherichia coli</i>	26.96
Uncultured organism clone VC1CF34TF	36.48
<i>Filifactor alocis</i>	43.37

Table 3.5 Percent Identity Matrix of collagenase: the result of percent identity matrix of collagenase gene of *Porphyromonas gingivalis* created by Clustal2.1.

<i>Species</i>	Percent Identity
Uncultured bacterium clone HA0AAA19ZB01RM1	68.18
Uncultured bacterium clone HA0AAA18ZG01RM1	45.54
<i>Prevotella denticola</i>	54.02
<i>Prevotella melaninogenica</i>	55.86
<i>Prevotella intermedia</i>	53.33
<i>Prevotella sp. oral taxon299</i>	54.05
<i>Phorphyromonas asaccharolytica</i>	55.09
Uncultured bacterium clone LM0ACA20ZD05FM1	62.09
<i>Prevotella dentalis</i>	38.12
<i>Tannerella forsythia</i>	37.77

Table 3.6 Percent Identity Matrix of RhAA1 gene: the result of percent identity matrix of Putative protease gene(RhAA1 gene)sequence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* created by Clustal2.1.

<i>Species</i>	Percent Identity
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	40.85
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	48.50
<i>Escherichia coli</i>	48.44
<i>Haemophilus influenzae</i>	78.76

Table 3.7 Percent Identity Matrix of Cytolethal distending toxin gene: the result of percent identity matrix of Cytolethal distending toxin gene sequence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* created by Clustal2.1.

<i>Species</i>	Percent Identity
<i>Haemophilus ducreyi</i>	94.72
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	77.38
<i>Helicobacter sp.</i>	72.60

Table 3.8 Percent Identity Matrix of Kgp gene : the result of percent identity matrix of Kgp gene(Lys-gingipain gene)sequence of *Porphyromonas gingivalis* created by Clustal2.1.

<i>Species</i>	Percent Identity
<i>Neisseria meningitidis</i>	45.18
Uncultured organism clone 1041059767171	45.42
<i>Prevotella dentalis</i>	71.43
<i>Tannerella forsythia</i>	35.82
Uncultured bacterium AST2	49.28
<i>Prevotella intermedia</i>	38.44
<i>Prevotella denticola</i>	36.36

Table 3.9 Percent Identity Matrix of RGP-2 gene for gingipain regulator: the result of percent identity matrix of Arginine-specific cysteine proteinase gene(RGP-2 gene) sequence of *Porphyromonas gingivalis* created by Clustal2.1.

<i>Species</i>	Percent Identity
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	75.37
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	57.85
Uncultured organism clone 1041059767681	30.10
<i>Treponema denticola</i>	42.14
<i>Prevotella denticola</i>	40.37

Table 3.10 Percent Identity Matrix of gppX gene: the result of percent identity matrix of gppX gene sequence of *Tannerella forsythia* created by Clustal2.1.

<i>Species</i>	Percent Identity
<i>Prevotella denticola</i>	27.27
<i>Prevotella intermedia</i>	26.69
<i>Bacillus subtilis</i>	30.30
<i>Rothia mucilaginosa</i>	35.71
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	26.60
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	89.58
<i>Prevotella dentalis</i>	39.34

Table 3.11 Percent Identity Matrix of fipA gene: the result of percent identity matrix of fipA gene(Immunosuppressive protein gene) sequence of *Fusobacterium nucleatum* created by Clustal2.1.

<i>Species</i>	Percent Identity
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. animalis</i>	94.10
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum</i>	90.14
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum</i>	89.58
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii</i>	55.90

Table 3.12 Percent Identity Matrix of Hemagglutinin gene: the result of percent identity matrix of Hemagglutinin gene sequence of *Prevotella intermedia* created by Clustal2.1.

<i>Species</i>	Percent Identity
Uncultured organism clone VC1CW75TR	35.85
Uncultured Sphingobacteria bacterium	38.38
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	46.09
<i>Prevotella dentalis</i>	43.84
<i>Prevotella denticola</i>	47.48
<i>Prevotella sp.</i> oral taxon 299	47.71
<i>Prevotella melaninogenica</i>	72.07

Table 3.13 Percent Identity Matrix of Elastase precursor gene: the result of percent identity matrix of Elastase precursor gene sequence of *Prevotella intermedia* created by Clustal2.1.

<i>Species</i>	Percent Identity
<i>Gardnerella vaginalis</i>	85.00
<i>Bacillus anthracis</i>	42.86
<i>Streptococcus agalactiae</i>	38.78
<i>Streptococcus parasanguini</i>	41.86

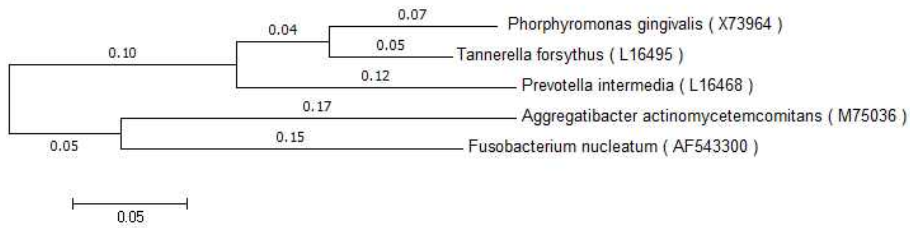


Figure 3.8 Phylogenetic tree(ML) based on periodontal pathogens: the result of phylogenetic tree using maximum likelihood method based on periodontal pathogen.

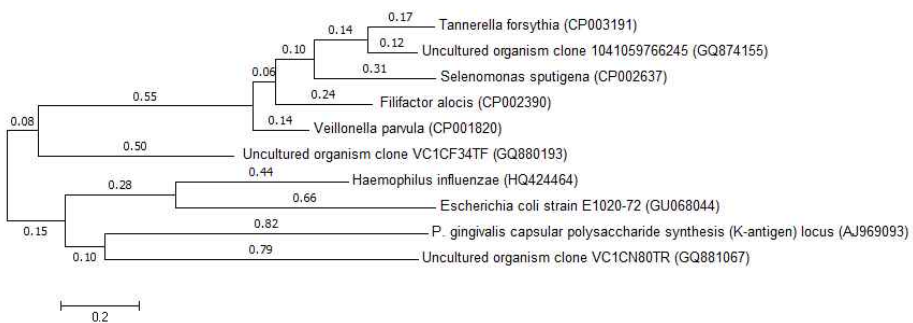


Figure 3.9 Phylogenetic tree(ML) based on Capsular polysaccharide synthesis gene: the result of phylogenetic tree using maximum likelihood method based on Capsular polysaccharide synthesis gene sequence of *Porphyromonas gingivalis*.

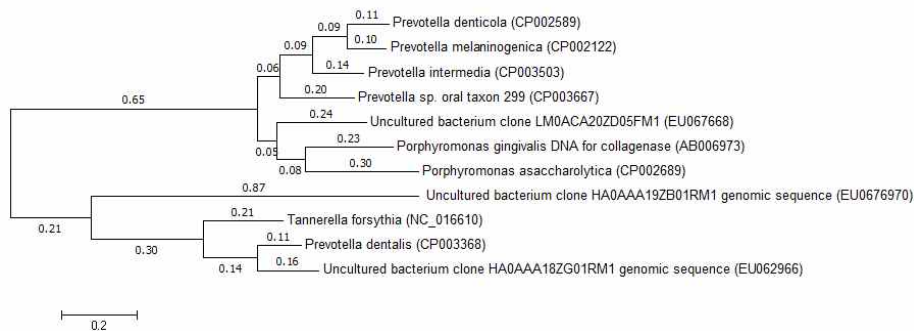


Figure 3.10 Phylogenetic tree(ML) based on Collagenase gene: the result of phylogenetic tree using maximum likelihood method based on Collagenase gene sequence of *Porphyromonas gingivalis*.

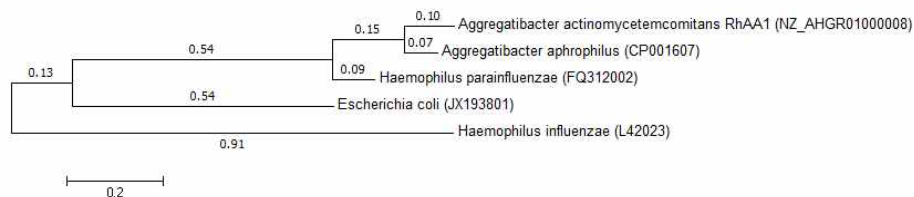


Figure 3.11 Phylogenetic tree(ML) based on RhAA1 gene: the result of phylogenetic tree using maximum likelihood method based on Putative protease gene(RhAA1 gene)sequence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

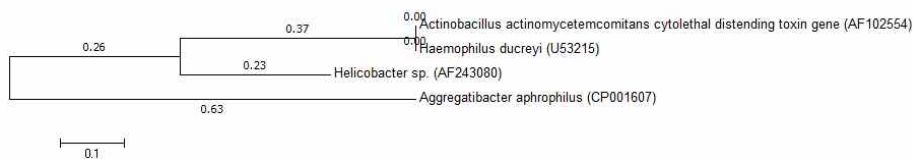


Figure 3.12 Phylogenetic tree(ML) based on Cytolethal distending toxin gene: the result of phylogenetic tree using maximum likelihood method based on Cytolethal distending toxin gene sequence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

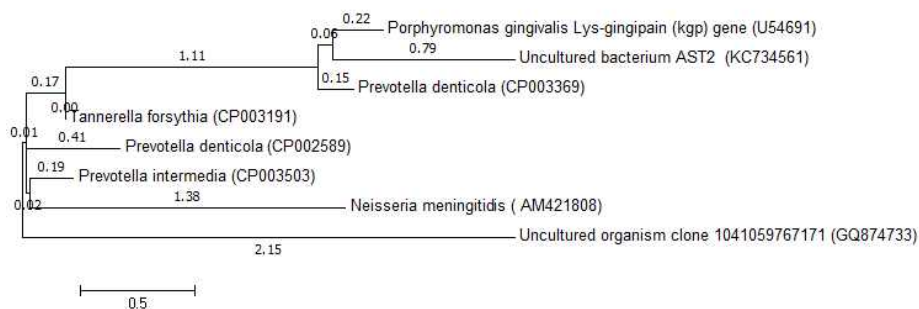


Figure 3.13 Phylogenetic tree(ML) based on Kgp gene: the result of phylogenetic tree using maximum likelihood method based on Kgp gene(Lys-gingipain gene)sequence of *Porphyromonas gingivalis*.

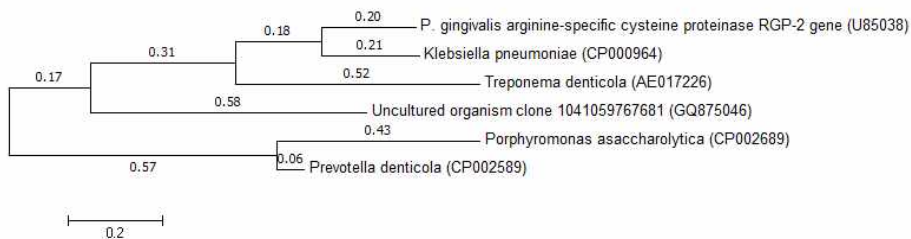


Figure 3.14 Phylogenetic tree(ML) based on RGP-2 gene for gingipain regulator: the result of phylogenetic tree using maximum likelihood method based on Arginine-specific cysteine proteinase gene(RGP-2 gene) sequence of *Porphyromonas gingivalis*.

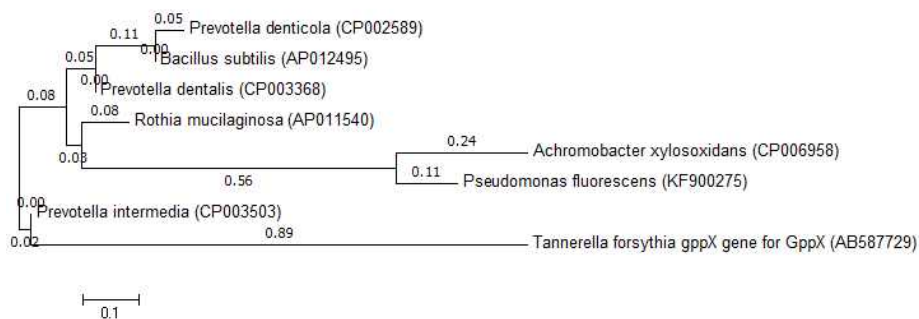


Figure 3.15 Phylogenetic tree(ML) based on gppX gene: the result of phylogenetic tree using neighbor maximum likelihood based on gppX gene sequence of *Tannerella forsythia*.

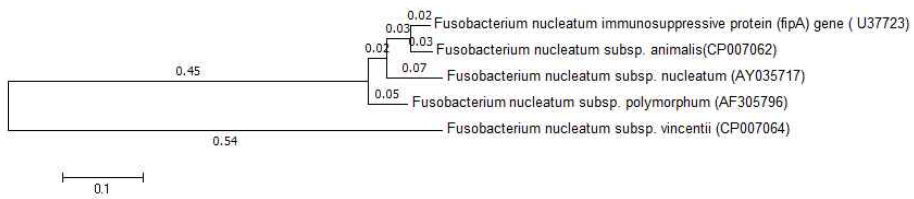


Figure 3.16 Phylogenetic tree(ML) based on *fipA* gene: the result of phylogenetic tree using maximum likelihood method based on *fipA* gene(Immunosuppressive protein gene) sequence of *Fusobacterium nucleatum*.

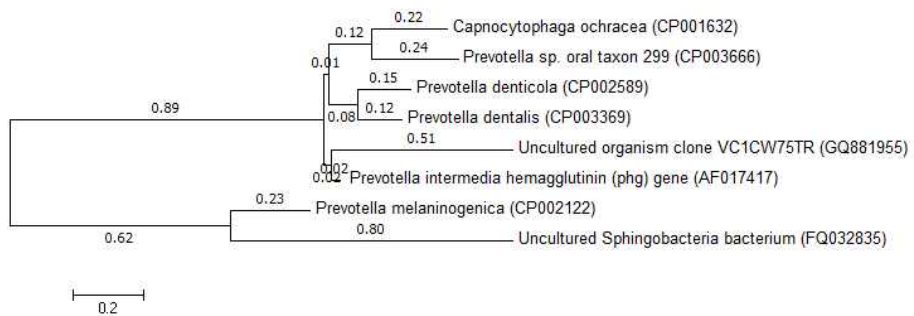


Figure 3.17 Phylogenetic tree(ML) based on Hemagglutinin gene: the result of phylogenetic tree using maximum likelihood method based on Hemagglutinin gene sequence of *Prevotella intermedia*

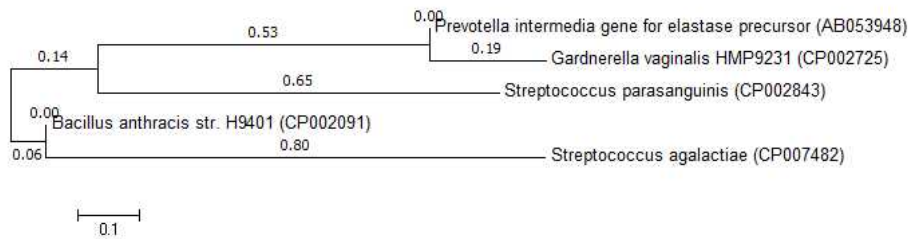


Figure 3.18 Phylogenetic tree(ML) based on Elastase precursor gene: the result of phylogenetic tree using maximum likelihood method based on Elastase precursor gene sequence of *Prevotella intermedia*.

제 4 장. 고 찰 및 결 론

(DISCUSSION & CONCLUSION)

본 연구의 목적은 치주 질환 원인균에 있는 병독성 인자들과 모든 구강 미생물의 유전자 서열 데이터를 통합한 데이터베이스를 구축하여 기존에 치주 질환과 관련이 없거나 그 연관성이 불확실하다고 간주되던 종들 사이에서 임상적으로 정확한 치주 질환 원인균을 찾아내어 그에 대한 정보를 제공하는 것이다. 연구결과를 보면 주요 치주 질환 원인균 5종에 있는 10개의 병독성 인자와의 유전적 유사성의 정도를 비교, 분석하여 잠재적인 치주 질환 원인균으로 추정할 수 있는 종은 총 13종으로 제안될 수 있다. 이들은 주요 치주 질환 원인균들 5종들 사이의 ‘pair-wise alignment’ 결과 얻은 유전적 유사성의 정도가 최소치인 69.48% 이상을 보이는 종 들이며, ‘*Prevotella melaninogenica*’, ‘*Prevotella dentalis*’, ‘*Gardnerella vaginalis*’, ‘*Achromobacter xylosoxidans*’, ‘*Porphyrromonas asaccharolytica*’, ‘*Haemophilus influenzae*’, ‘*Haemophilus ducreyi*’, ‘*Aggregatibacter aphrophilus*’, ‘*Veillonella parvula*’, ‘*Helicobacter sp.*’, ‘*Fusobacterium nucleatum subsp. animalis*’, ‘*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*’, ‘*Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum*’가 이에 해당된다.

‘*Prevotella intermedia*’의 병독성 인자인 ‘Hemagglutinin gene’과 유사한 유전자를 갖는 ‘*Prevotella melaninogenica*’는 과거에 ‘*Bacteroides melaninogenicus*’로 불렸으며, 의간균문(Bacteroidetes)에 속하는 그람음성의 절대 혐기성 구강균이다. 이 종이 갖는 ‘black pigment’와 ‘black colonies’를 형성하는 특징에 따라 이름 붙여졌으

며, 이는 구강 및 상부 호흡기에 서식하는 상주균으로, 치태 내 고유 구강 미생물과 복합적으로 작용하여 피하 감염전이에 중요한 역할을 하는 기회감염균이다. 또 식균작용을 방해하고 숙주의 면역체계를 자극하여 치주조직을 파괴할 수 있는 물질을 생산하도록 한다. 보통 '*Prevotella spp.*'들은 치주질환과 치주 농양의 발병에 있어 중요한 역할을 하는데, 특히 '*Prevotella melaninogenica*'는 다운증후군(Down syndrome) 환자의 치태 내에서 높은 빈도로 검출된다. 치태를 형성하며, 빠르게 진행되는 치주 질환자의 구강 내에서 검출되기도 하는 '*Prevotella melaninogenica*'는 치주질환에 관여하는 동안 collagenase를 합성하여 숙주의 조직을 직접적으로 손상시켜 염증반응을 유도함으로써 의학적으로 병원 미생물에 상응하는 병독성 요인으로써 작용하기도 한다(Komann & Loesche, 1982). '*Porphyromonas gingivalis*'의 병독성 인자인 'Kgp gene(Lys-gingipain gene)'과 유전적으로 유사한 '*Prevotella dentalis*'는 의간균문(Bacteroidetes)에 속하는 그람음성의 비운동성 간균으로, 건강한 사람들의 구강에 상주하는 비색소 상주균이다. 간혹 치은연하에 위치한 치태에서 검출되기도 하고, 이미 감염되었던 부위에서 더 큰 감염을 일으키며, 치주 질환이 진행되는 동안 그 수와 비율이 증가한다(Willems & Collins, 1995). '*Prevotella intermedia*'의 병독성 인자인 'Elastase precursor gene'과 유전적으로 85.00% 일치하며 혐기성의 비운동성 그람다양성 구간균인 '*Gardnerella vaginalis*'는 방선균문(Actinobacteria)에 속하며 그람양성의 세포벽을 갖고 있지만, 그 두께가 매우 얇아 그람음성으로도 관찰되는 그람 다양성 세균이다. '*Gardnerella vaginalis*'는 여성의 질속에 살면서 여성의 질염을 일으키는 가장 흔한 원인균이다. 평소에는 질 내 상주균으로써 유산균에 의해서 억제되어 있다가 질 내 정상 세균총의 균형이 깨지면서 이 균의 비중이 커지면 질염을 유발하며, 여성에게 질염, 골반염, 요로

감염, 자궁 내막염 등을 일으킬 수 있다. 또한 단백질 분해효소 및 ‘sialidase enzyme activities’를 갖는 ‘*Gardnerella vaginalis*’는 오로지 인간의 세포에만 영향을 미치는 ‘pore-forming toxin’인 vaginolysin을 생성하는 특징을 갖는다(Gelber et al., 2008). ‘*Tannerella forsythia*’의 병독성 인자인 ‘gppX gene’과 유전적으로 유사한 ‘*Achromobacter xylosoxidans*’는 프로테오박테리아문(Proteobacteria)에 속하는 그람음성의 혐기성 세균으로 편모가 있는 운동성 세균이다. 고유의 본질적인 병원성은 매우 낮음에도 불구하고, 특히 면역이 억제된 환자에게서 높은 사망률을 보이는 심각한 감염의 원인균으로 섬유증 환자에게서 균혈증과 같은 감염성 질환을 일으키는 원인균으로 작용한다(Eshwara et al., 2011). ‘*Porphyromonas asaccharolyticus*’는 의간균문(Bacteroidetes)에 속하는 그람음성의 혐기성 세균으로 ‘*Porphyromonas gingivalis*’의 병독성 인자인 ‘RGP-2 gene’과 유전적으로 유사한 종이다. 이 종은 단독으로 감염을 일으키지는 않으나 구강, 비뇨 생식기, 복강 내 종양, 당뇨병 궤양 등과 관련된 혼합 감염에서 매우 중요한 요소이다(Caiano et al., 2013). ‘*Actinobacillus actinomycetemcomitans*’의 병독성 인자인 ‘RhAA1 gene’과 78.76%의 유전적 유사성을 보임으로써 기준치 이상의 값을 보인 ‘*Haemophilus influenzae*’는 프로테오박테리아문(Proteobacteria)에 속하는 그람음성의 혐기성 세균으로 다형성의 구간균이다. ‘*H. influenzae*’에 의한 감염에 대한 발병기전은 아직 밝혀지지 않았으나, 이 종의 대부분의 변종은 기회 병원균이다. 이는, 일반적으로 질병을 유발하지 않고 자신의 숙주에 살고 있지만, 바이러스에 감염되거나 알레르기 만성염증 조직에 의해 면역 기능에 문제가 생기는 경우에만 문제가 발생한다. 주로 기도에서 검출되는 세균인 ‘*H. influenzae*’는 그들의 ‘Triple Autotransporter Adhesins(TAA)’을 사용하여 숙주 세포에 붙어 호스트를 감염시키며 만성 기관지염에서 급성 기관지염으로 증상이

악화 되는 것에 관여하는 것은 물론 폐렴, 급성 결막염, 중이염, 어린이들의 화농성 뇌수막염 등의 급성, 호흡기 감염을 일으키는 원인균이다(Puri et al., 1999). ‘*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*’의 병독성 인자인 ‘CDT gene’과 유전적으로 유사한 종으로 ‘*Haemophilus ducreyi*’, ‘*Aggregatibacter aphrophilus*’, ‘*Helicobacter sp.*’를 찾을 수 있었다. ‘*Haemophilus ducreyi*’는 ‘CDT gene’과 94.72%의 유전적 유사성을 보였으며, ‘*Haemophilus influenzae*’와 마찬가지로 프로테오박테리아문(Proteobacteria)에 속하는 그람음성, 혐기성의 다형성 구간균이다. 건강한 사람들의 구강에도 서식하는 일반적인 구강 상주균이지만, 성 전파성 질환을 일으키는 세균으로 궤양성 질환인 연성하감을 일으키는 원인균이다. ‘*Aggregatibacter aphrophilus*(구 *Haemophilus aphrophilus*)’는 프로테오박테리아문(Proteobacteria)에 속하는 그람음성의 혐기성 세균으로 길이가 짧은 간균이다. 건강한 사람들의 구강이나 구강 인두에서 검출되는 세균으로 특히 치아와 치아 사이, 치주낭 내의 치태에서 자주 검출되는 구강 상주균이다. 하지만 기회감염균으로 종종 감염성 심내막염, 뇌종양을 일으키는 경우도 있다(Ratnayake et al., 2011). ‘*Helicobacter sp.*’는 프로테오박테리아문(Proteobacteria)에 속하는 그람음성균으로 나선모양이 특징이다. 조류나 포유류의 간과 같은 소화기관 위쪽 부분에서 서식하며 포유류의 위에 많은 양의 우레아제를 생성함으로써 장 내 환경을 산성으로 만든다(Hua et al., 1999). ‘*Veillonella parvula*’는 후벽균문(Firmicutes)에 속하며 spore를 형성하지 않는 그람음성의 절대 혐기성 구간균이다. 사람이나 동물의 구강 내에 있는 치태나 소화기관에서 검출되며, 치태 내에서 ‘*Streptococcus mutans*’와 같은 다른 균들과 함께 집락을 형성하여 치태에 잘 부착할 수 있도록 서로 돕는다. 병원균은 아니나, 드문 경우이지만 뇌수막염, 골수염, 치주 질환과 관련이 있으며, 이런 질병에서 lipopolysaccharide가 이 종의 병독성 인자로써

작용한다(Luppens et al., 2008). ‘*Fusobacterium nucleatum*’의 병독성 인자인 ‘*fipA gene*’과 기준치 이상의 유전적 유사성을 보인 종으로는 ‘*Fusobacterium nucleatum subsp. animalis*’, ‘*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*’, ‘*Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum*’를 찾을 수 있었다. ‘*Fusobacterium nucleatum subsp.*’는 푸소박테리움균문(Fusobacteria)에 속하며 spore를 형성하지 않는 그람음성균으로, *animalis*, *nucleatum*, *polymorphum*, *vincentii*, *fusiforme*의 5가지로 분류된다. 이들은 사람과 동물의 병원균으로 널리 알려져있으며, 사람과 동물의 점액 상피세포의 표면에 서식하면서 서식환경에 직접적으로 영향을 미치진 않으나, 치태에 서식하는 그람음성 세균들과 그람양성 세균들의 부착을 돕는다. 이 중 ‘*fipA gene*’과 유전적으로 94.10% 일치하는 것으로 나타난 ‘*F. nucleatum subsp. animalis*’는 사람의 치은연하에 위치한 치태내에서 검출되며, ‘*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*’는 타액의 ‘ α -amylase’와 결합한다. ‘*Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum*’는 주로 사람의 임플란트 주위염으로 인한 병변에서 검출되었다. 이 종은 임플란트 주위염을 포함한 치주 질환을 일으키는 원인 요소 중 하나로 추정되고 있다(Citron, 2014).

주요 치주 질환 원인균 5종에 있는 11개의 병독성 인자와의 유전적 유사성을 기준으로 선택한 이 구강 미생물들은 물론 현재 치주 질환의 원인균으로 추정되는 종도 있지만, 대부분 건강한 사람들의 구강 내에서 검출되는 정상적인 구강 상주균이거나 자체의 병원성은 매우 낮은 균들이다. 이들은 구강 내 정상 세균총(microflora)의 균형이 깨지면서 숙주의 면역체계에 이상이 생기면 병원성을 보이는 기회감염균들이며, 이때 나타나는 그들의 병독성은 강력하다. 따라서 본 연구의 결과로 그동안 치주 질환과의 연관성이 불확실하다고 간주되던 종들 사이에서 잠재적으로 치주 질환을 유발하는 원인균을 찾아 낼 수 있었다. 이는 향후 치주 질환에 대한 정확한 진

단 및 효과적인 치료, 치주 질환을 일으키는 다양한 원인균의 분류 및 지속적인 데이터의 보존 및 관리에 이용될 수 있을 것이다.

4.1 활용방안 (Utilization)

본 연구에서 구축한 데이터베이스인 PPVF는 사람의 구강에 서식하는 것으로 밝혀진 모든 구강미생물들의 계통 분류학적 정보와 유전자 서열 및 '*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'를 비롯한 5가지 주요 치주 질환 원인균에서 숙주의 치주조직을 파괴하는 역할을 하는 11가지 병독성 인자들의 유전자 서열을 포함하고 있다. 이를 통해 치주조직을 파괴하는 병독성 인자의 종류 및 기능을 정확히 파악하고, 이와 유전적, 기능적으로 유사한 인자를 포함하는 구강 미생물 종을 찾아냄으로써 기존에 치주 질환 원인균과의 관련성이 약하다고 간주되던 종들 사이에서 새로운 치주 질환 원인균을 추정하였다. 유전적, 기능적 유사성을 분석하는 연구는 기존에 치주 질환자의 병변부위에서 채취한 균이 치주 질환을 일으키는 원인균인지, 치주 질환 병변에서 이차적으로 집락을 형성하며 서식하는 종인지를 판단하는 과정에 정확성을 부여할 수 있다. 이렇게 새로이 발굴한 치주 질환 원인균들의 병독성 인자에 대한 연구를 통해, 또 다른 새로운 치주 질환 원인균을 찾을 수 있다는 가능성이 제기된다.

본 연구의 결과는 치주 질환 원인균의 유전적 특이성에 기반을 둔 항생제 및 치료제의 개발 연구 등에 기초자료를 제공함으로써 정확한 진단과 효율적인 치주치료에 도움이 될 것이라 전망한다. 일반적인 항생제 처방 및 기계적인 치주치료에 의해 병변부위가 완치되지 않고, 계속하여 재발하는 환자들을 재발성 치주질환자라 정의한다. 지금까지의 연구결과를 종합해보면 이들의 병변부위에서는 치주질환을 유발하는 특정 세균의 level이 증가하는 것으로 나타났다으며, 이들 세균을 타겟으로 한 항생제 처방 결과 치주 상태가 호전되는 것을 확인할 수 있었다(Loomer, 2004). 정확한 원인균 파악을

통한 적절한 약제의 처방은 정상 세균총의 균형을 꺾 수 있는 ‘Broad spectrum’의 기존 약제들이 지니는 단점을 극복하여 정상적인 구강 상주균의 항상성을 유지함으로써, 기회 감염균의 병원성 발현 기회를 차단할 수 있다. 한편, 치주질환을 일으키는 병원균들이 주로 치주질환의 진행 정도에 따라 깊어지는 치주낭 내에 서식한다는 점에 착안하여, 치주낭 내에서 검출되는 병원균에 특이적으로 감수성이 크며, 치주낭 내에 직접 투여할 수 있는 약제 개발도 가능할 것이다. 이는 치주낭 내에서 유효농도 이상을 유지할 수 있으며, 전신적인 약물 투여로 나타날 수 있는 부작용을 감소시킬 수 있다. 또한 스케일링, 치근활택술 등의 치과 치료에 병용시 치주낭 깊이 감소, 치은 증진 및 부착수준 개선의 효과를 보일 수 있을 것이다. 기존의 임상위주의 병리학적 현상에 국한되어있던 약제 연구에 생명정보학적인 기법을 적용함으로써 새로운 실험기법의 방향을 제시할 수 있어 구강건강 유지 및 향상에 기여할 것이라 믿는다.

4.2 보건학적 연구에 적용 (Application to Health Studies)

본 연구에서 구축한 데이터베이스는 치주 질환 원인균을 포함한 모든 구강 미생물의 유전정보를 통합하였으며 생명정보학적/전산생물학적인 기반연구가 가능하도록 BLAST를 웹 데이터베이스에서 수행할 수 있도록 하였다. 따라서 본 데이터베이스를 이용함으로써 치주 질환의 정확한 진단 및 치료 그리고 예방을 위한 보건학적 연구의 효율성과 정확성을 높일 수 있을 것이다. 최근까지의 치주 질환 원인균에 대한 연구에서는 치주 질환자들을 대상으로 진행한 샘플 채취를 비롯한 임상적, 통계학적 연구가 대부분이었다. 이에 따라 본 연구에서 구축한 치주 질환 원인균의 검색 시스템을 이용한다면, 치주 질환의 인과관계를 규명할 수 있는 연구 자료로 활용함으로써 의학적, 보건학적 난제에 대한 새로운 가능성을 제시할 수 있을 것이며 따라서 한국인의 대표적인 만성질환인 치주 질환의 유병률을 감소시키고 구강건강을 향상하는 데에 이바지함으로써, 관련 의료비용을 절감하여 보건학적으로도 높은 성과를 기대할 수 있을 것이다.

4.3 향후 보완 및 추가계획 (Futural Complements & Additional Plan)

치주 질환은 치주조직의 건강상태나 치주 질환의 다양한 형태에 따라 치은연하에 존재하는 미생물들의 조성이 매우 다양하게 나타날 수 있다. 지금까지의 치주 질환에 관한 연구들은 주로 치주 질환의 원인균으로 추정되는 세균들과 그들의 산물에 대해 초점을 맞추었다. 본 연구에서 구축한 데이터베이스도 현재까지 밝혀진 박테리아 레벨의 모든 구강 미생물 대한 유전자 서열정보를 포함하며, 기존의 치주 질환 원인균으로 밝혀진 세균들이 갖는 병독성 인자들의 유전자 서열정보도 포함하고 있다. 세균의 병독성 인자들이 숙주의 면역 반응을 억제하는 기능을 하듯이, 다양한 바이러스들도 치주염의 병인과정에 있어서 역할을 할 것으로 생각된다. 대식세포, 림프구 등을 감염시켜 이들의 기능을 손상시키거나 염증세포들이 바이러스에 감염되어 숙주의 방어기전이 약화되고 항상성이 무너지면서, 숙주가 건강한 상태일 때 정상 세균총으로 존재하던 세균들로 하여금 구강질환의 발생을 유발할 수 있다. 이렇게 바이러스에 감염됨으로써 구강 내에 병원균이 증식함과 동시에 약해진 방어기전으로 인해 바이러스들은 더욱 효율적으로 세포로 침투할 수 있게 된다. 따라서 치주 질환을 일으키는 원인균 탐색을 넘어 치주 질환과 관련이 있는 바이러스들을 찾고, 그들의 유전정보를 포함하는 데이터베이스를 구축하고자 한다. 이들을 분석하여 치주 질환과 바이러스들 간의 연관성 등을 연구하고자 한다.

한편, 치주질환을 유발시키는 대표적인 원인균인 '*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'는 총 5가지의 serotypes을 갖으며, 이들의 분포는 이들이 서식하는 치주의 상태와 관련이 있는 것으로 밝혀졌다(Brígido et al., 2014). 또, 이들이 검출되는 숙주인

치주질환자에 있어 민족적 차이를 보이는데, 특히 치주질환에 이환된 한국인의 구강 내에서는 ‘serotype c’(61.9%)와 ‘serotype d’(19%)가 빈번하게 발견되는 것으로 밝혀졌다(Kim et al., 2009). 그러나 현재까지 특정 원인균이 갖는 serotype에 대한 민족적 차이에 대한 연구만 진행되었을 뿐, 치주질환을 유발하는 원인균들의 민족적 차이, 나아가 한국인에게 특이적인 치주질환 원인균에 대한 연구는 부재한 실정이다. 따라서 본 데이터베이스를 발전시켜 한국인의 구강 내에서 특이적으로 검출되는 치주질환 원인균에 대한 정보도 얻을 수 있도록 함으로써 연구자들로 하여금 보건학적 연구에 도움이 되도록 할 것이다.

BIBLIOGRAPHY

Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., Dewhirst, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. C. Microbiol* **45**, 5721- 5732 (2005).

Åberg, C. H., Sjödin, B., Lakio, L., Pussinen, P. J., Johansson, A., Claesson, R. Presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in young individuals: a 16-year clinical and microbiological follow-up study *J. C. Periodontol* **36**, 815– 822 (2009).

Albandar, J. M., Rams, T. E. Global epidemiology of periodantal diseases: an overview. *Periodontol 2000* **29**, 7- 10 (2002).

Armitage, G. C. Development of classification system for periodontal diseases and conditions. *A. Periodontol* **4**, 1- 6 (1999).

Asikainen, S., Alaluusua, S., Kari, K., Kleemola-Kujala, E. Subgingival microflora and periodontal conditions in healthy teenagers. *J. Periodontol* **57**, 505- 509 (1986).

Brinkman, F. S. L., Leipe, D. D. PHYLOGENETIC ANALYSIS *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Second Edition* 323- 358 (2001).

Burdon, K. L. *Bacterium melaninogenicum* from normal and pathologic tissues. *J. I. Dis* **42**, 161- 171 (1928).

Caiano, G. J., Calisto, R., Amado, J., Barreto, V. *Eikenella corrodens* and *Porphyromonas asaccharolytica* pleural empyema in a diabetic patient with obstructive sleep apnea syndrome on noninvasive ventilation. *Rev Port Pneumol.* **19**, 76- 79 (2013).

Chalaby, K., Saglie, R. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion during development of experimental periodontitis in rats. *D. Res* **68**, 286 (1989).

Christersson, L. A., Fransson, C. L., Dunford, R. G., Zambon, J. J. Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis. *J. Periodontol* **63**, 418- 425 (1992).

Chun H. W. Analysis of factors for relationship between oral disease and chronic disease. *Wonkwang Univ* (2011).

Citron, D. M. Update on the Taxonomy and Clinical Aspects of the Genus *Fusobacterium*. *C. I. Disease* **35**, 22- 27 (2002).

Cobb, C. M. Microbes, inflammation, scaling and root planing, and the periodontal condition. *J. D. Hyg* **3**, 4- 9 (2008).

Dewhirst, F. R., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W. H., Lakshmanan, A., Wade, W. G. The Human Oral Microbiome. *J. Bacteriol* **192**, 5002– 5017 (2010).

Dibart, S., Skobe, Z., Snapp, K., Socransky, S. S., Smith, C. M. Detection of subgingival species on or in epithelial cells. *J. D. Res* **73**, 161 (1994).

Dzink, J. L., Socransky, S. S., Ebersole, J. L., Frey, D. E. ELISA and conventional techniques for identification of black-pigmented *Bacteroides* isolated from periodontal pockets. *J. P. Res* **18**, 369- 374 (1983).

Dzink, J. L., Socransky, S. S., Haffajee, A. D. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J. C. Periodontol* **15**, 316- 323(1988).

Dzink, J. L., Gibbons, R. J., Childs, W. C., Socransky, S. S. The predominant cultivable microbiota of crevicular epithelial cells. *O. M. Immunol* **4**, 1- 5 (1989).

Ebersole, J. L., Frey, D. E., Taubman, M. A., Smith, D. J. An ELISA for measuring serum antibodies to *A. actinomycetemcomitans*. *J. P. Res* **15**, 621- 632 (1980).

Ebersole, J. L., Kornman, K. S. Systemic antibody responses to oral microorganisms in the cynomolgus monkey: development of methodology and longitudinal responses during ligature-induced disease. *R. Immunol* **142**, 829- 839 (1991).

Eshwara, V. K., Mukhopadhyay, C., Mohan, S., Prakash, R., Pai, G. Two unique presentations of *Achromobacter xylosoxidans* infections in clinical settings. *J. I. D. Ctries* **5**, 138- 141 (2011).

Estrela, C. R., Pimenta, F. C., Alencar, A. H., Ruiz, L. F., Estrela, C. Detection of selected bacterial species in intraoral sites of patients with chronic periodontitis using multiplex polymerase chain reaction. *J. A. O. Sci* **18**, 426- 431 (2010).

Garcia, R. I., Feldman, R. S., Alman, J. E., Chauncey, H. H. Smoking and periodontal diseases: a ten year longitudinal analysis. *J. D. Res* **67**, 372 (1988).

Garlet, G. P., Avila-Campos, M. J., Milanezi, C. N., Ferreira, B. R., Silva, J. S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *M. Infection* **7**, 738- 747 (2005).

Gelber, S. E., Aguilar, J. L., Lewis, K. L. T., Ratner, A. J. . Functional and Phylogenetic Characterization of Vaginolysin, the Human-Specific Cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. *J. Bacteriol.* **190**, 3896 - 3903 (2008).

Guan, S. M., He, J. J., Zhang, M., Shu, L. Prevotella intermedia stimulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-2 expression via multiple signaling pathways in human periodontal ligament cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **62**, 91- 100 (2011).

Haffajee, A. D., Dzink, J. L., Socransky, S. S. Effect of modified Widman flap surgery and systemic tetracycline on the subgingival microbiota of periodontal lesions. *J. C. Periodontol* **15**, 255- 262 (1988).

Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Dzink, J. L., Taubman, M. A., Ebersole, J. L. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. *J. C. Periodontol* **15**, 390- 398 (1988).

Haffajee, A. D., Socransky, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**, 78- 111 (1994).

Heitz-Mayfield, L. J., Schätzle, M., Loe, H., Bärgin, W., Anerud, A., Boysen, H., Lang, N. P. Clinical course of chronic periodontitis. II. Incidence, characteristics and time of occurrence of the initial periodontal lesion. *J. C. Periodontol* **30**, 902- 908 (2003).

Holmstrup, P., Glick, M. Treatment of periodontal disease in the immunodeficient patient. *Periodontol 2000* **28**, 190- 205 (2002).

Hua, J. S., Zheng, P. Y., Ho, B. Species differentiation and identification in the genus of Helicobacter. *W. J. Gastroenterol* **5**, 7 - 9 (1999).

J.P. (No authors listed.) Parameter on Plaque-Induced Gingivitis. *J. Periodontology* **71**, 851 - 852 (2000).

Kesic, L., Milasin, J., Igic, M., Obradovic, R. Microbial ethiology of periodontal disease-mini review. *M. Biology* **15**, 1- 6 (2008).

Kiley P, Holt SC. Characterization of the lipopolysaccharide from Actinobacillus actinomycetemcomitans Y4 and N27. *I. Immun* **30**, 862-873 (1980).

Komann, K. S., Loesche, W. J. Effects of estradiol and progesterone on Bacteroides melaninogenicus and Bacteroides gingivalis. *Infect Immun* **35**, 256- 263 (1982).

Lai, C. H., Listgarten, M. A., Shirakawa, M., Slots, J. Bacteroides forsythus in adult gingivitis and periodontitis. *O. M. Immunol* **2**, 152-157 (1987).

Lang, N. P., Schätzle, M. A., Loe, H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J. C. Periodontol* **10**, 3- 8 (2009).

Lee, S. K., Lee, K. W., Chang, K. W. Reasons for extracted permanent teeth in Korean population. *J. K. A. O. Health* **25**, 139- 163 (2001).

Listgarten, M. A., Lai, C. H., Young, V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J. Periodontol* **64**, 155- 161 (1993).

Loesche, W. J., Syed, S. A., Laughon, B. E., Stoll, J. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J. Periodontol* **53**, 223- 230 (1982).

Loomer, P. M. Microbiological diagnostic testing in treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000* **34**, 49- 56 (2004).

Luppens, S. B., Kara, D., Bandounas, L., Jonker, M. J., Wittink, F. R., Bruning, O., Breit, T. M., Ten, C. J. M., Crielaard, W. Effect of *Veillonella parvula* on the antimicrobial resistance and gene expression of *Streptococcus mutans* grown in a dual-species biofilm. *Oral Microbial Immunol* **23**, 183- 189 (2008).

Macdonald, J. B., Sutton, R. M., Knoll, M. L., Madlener, E. M., Grainger, R. M. The pathogenic components of an experimental mixed infection. *J. I. Dis* **98**, 15- 20 (1956).

Macdonald, J. B., Socransky, S. S., Gibbons, R. J. Aspects of the pathogenesis of mixed anaerobic infections of mucous membranes. *J. D. Res* **42**, 529- 544 (1963).

Madianos, P. N., Bobetsis, Y. A., Kinane, D. F. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J. C. Periodontol* **32**, 57- 71 (2005).

Mager, D. L., Ximenez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D., Socransky, S. S. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J. C. Periodontol* **30**, 644- 654 (2003).

McCourtie, J., Poxton, I. R., Brown, R., Whittaker, C. R., Spence, J. A., Aitchison, G. U. A longitudinal study of the cultivable subgingival anaerobic bacteria isolated from sheep during the development of broken mouth periodontitis. *J. M. Microbiol* **31**, 275- 283 (1990).

Meyer, D. H., Lippmann, J. E., Fives-Taylor, P. M. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *I. Immun* **64**, 2988- 2997 (1996).

Michalowicz, B. S., DiAngelis, A. J., Novak, M. J., Buchanan, W. Treatment of Periodontal Disease and the Risk of Preterm Birth. *N. E. J. Med* **355**, 1885- 1894 (2006).

Murray, P. A., Burstein, D. A., Winkler, J. R. The microbiology of HIV-associated periodontal lesion. *J. C. Periodontol* **16**, 635- 642 (1989).

Offenbacher, S. Periodontal diseases: pathogenesis. *A. Periodontol* **1**, 821- 878 (1996).

Ogawa, T., McGhee, M. L., Moldoveanu, Z. *Bacteroides* specific IgG and IgA subclass antibody-secreting cells isolated from chronically inflamed gingival tissues. *C. E. Immunol* **76**, 103- 110 (1989).

Okamoto, M., Maeda, N., Kondo, K., Leung, K. P. Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Microbiol Lett* **17**, 299- 304 (1999).

Palacios, C., Joshipura, K. J., Willett, W. C. Nutrition and health: guidelines for dental practitioners. *O. Diseases* **15**, 369 - 381(2009).

Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A., Dewhirst, F. E. The breath of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other sites. *Periodontol 2000* **42**, 80- 87 (2006).

Plaut, H. C. Studien zur bakteriellen Diagnostik der Diphtherie und der Anginen. *D. M. Wochenschr* **20**, 920- 923 (1894).

Puri, J., Talwar, V., Juneja, M., Agarwal, K. N., Gupta, H. C. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory isolates of *Haemophilus influenzae*. *Indian Pediatr* **36** , 1029– 1032 (1999).

Ratnayake, L., Olver, W. J., Fardon, T. *Aggregatibacter aphrophilus* in a patient with recurrent empyema: a case report. *J. M. C. Reports* **5**, 448 (2011).

Rocas, I. N., Siqueira, J. F., Santos, K. R. N., Coelho, A. M. A., Haneiro, R. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: A molecular approach. *O. S. O. M. O. P. O. R. Endod* **91**, 468- 471 (2001).

Roe, D. E., Braham, P. H., Weinberg, A., Roberts, M. C. Characterization of tetracycline resistance in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *O. M. Immunol* **10**, 227- 232 (1995).

Rosenthal, I. M., Abrams, H., Kopczyk, R. A. The relationship of inflammatory periodontal disease to diabetic status in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J. C. Periodontol* **15**, 425- 429 (1988).

Saglie, F. R., Marfany, A., Camargo, P. Intragingival occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in active destructive periodontal lesions. *J. Periodontol* **59**, 259- 265

(1988).

Sakan-Seppala, B., Ainamo, J. Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. C. Periodontol* **19**, 24- 29 (1992).

Sandros, J., Papapanou, E., Dahlen, G. *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cells *in vitro*. *J. P. Res* **28**, 219- 226 (1993).

Sastrowijoto, S. H., Hillemans, P., van Steenberghe, T. J. M., Abraham-Inpijn, L., de Graaff, J. Periodontal condition and microbiology of healthy and diseased periodontal pockets in type 1 diabetes mellitus patients. *J. C. Periodontol* **16**, 316- 322 (1989).

Sbordone, L., Bortolaia, C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: Microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *C. O. Invest* **7**, 181- 188 (2003).

Schätzle, M., Löe, H., Bürgin, W., Anerud, A., Boysen, H., Lang N. P. Clinical course of chronic periodontitis. *J. C. Periodontol* **30**, 902 - 908 (2003).

Shah, H. N., Gharbia, S. E. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *I. J. S. Bacteriol* **42**, 542- 546 (1992).

Signat, B., Roques, C., Poulet, P., Duffaut, D. Role of *Fusobacterium nucleatum* in Periodontal Health and Disease. *C. I. M. Biol* **13**, 25- 36 (2011).

Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Dzink, J. L., Hillman, J. D. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *O. M. Immunol* **3**, 1- 7 (1988).

Sreenivasan, P. K., Meyer, D. H., Fives-Taylor, P. M. Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *I. Immun* **61**, 1239- 1245(1993).

Stoltenberg, J. L., Osborn, J. B., Pihlstrom, B. L. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *J. Periodontol* **64**, 1225- 1230 (1993).

Tamura, K., Peterson D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods *M. B. Evol* **28**, 2731- 2739 (2011).

Tanner, A. C. R., Dzink, J. L., Ebersole, J. L., Socransky, S. S. *Wolinella recta*, *Campylobacter concisus*, *Bacteroides gracilis*, and *Eikenella corrodens* from periodontal lesions. *J. P. Res* **22**, 327- 330 (1987).

Taubman, M. A., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Smith, D. J., Ebersole, J. L. Longitudinal monitoring of humoral antibody in subjects with destructive periodontal diseases. *J. P. Res* **27**, 511- 521 (1992).

Wiebe, C. B., Putnins, E. E. The Periodontal Disease Classification System of the American Academy of Periodontology — An Update *J. C. D. Assoc* **66**, 594- 597 (2000).

WILLEMS, A., COLLINS, M. D. 16S rRNA gene similarities indicate that *Hallella seregens* and *Mitsuokella dentalis* (Haapasalo et al.) are genealogically highly related and are members of the genus *Prevotella*: emended description of the genus *Prevotella* (Shah and Collins) and description of *Prevotella dentalis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 832- 836 (1995).

Winkelhoff, A. J., Velden, U., Graaff, J. Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. *J. C. Periodontol* **15**, 116- 122 (1988).

Zambon, J. J., DeLuca, C., Slots, J., Genco, R. J. Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycescomitans* using the promyelocytic RL-60 cell line. *I. Immun* **40**, 205- 212 (1983).

Zambon, J. J. *Actinobacillus actinomycescomitans* in human periodontal disease. *J. C. Periodontol* **12**, 1- 20 (1985).

Zambon, J. J. Periodontal Diseases: Microbial Factors *A. Periodontol* **1**, 879- 925 (1996).

Zambon, J. J., Grossi, S. G., Machtei, E. E., Ho, A. W., Dunford, R., Genco, R. J. Cigarette smoking Increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J. Periodontol* **67**, 1050- 1054

(1996).

Zvelebil, M. J., Baum, J. Q. Understanding Bioinformatics *Gerland Science* (2008).

ABSTRACT

Classification of Periodontal Pathogens Based on Genetic Specificity

Song, Yeon-Jeong
Bioinformatics Major
Graduated School of Public Health
Seoul National University

Periodontal disease is a destructive, inflammatory disease of the supportive structures of the teeth and oral bacteria and their products are the causes of tissue destruction. So far about 600 species of oral microorganisms have been identified and other 200 species of microorganisms were detected in the oral cavity of the patients who were affected with periodontal disease. Among them, only about 10 species were identified as causative agents of periodontal diseases and these are mainly anaerobic, gram-negative bacteria. Periodontal pathogen should possess virulence factors relevant to the inflammation on periodontal tissue. The virulence factors of periodontal pathogens are composed of destructive factors to periodontal tissue and immuno-suppressive factors of host. Because of the limits of the morphological classification of bacteria, the importance of the classification of oral microbial using genome sequences is gradually increased. Thus, the recent developments of molecular biology result in many researches about classification of oral microbial using genetic

markers. But the database that integrates information from genetic sequences of periodontal pathogens is not sufficient. Therefore, this research included the construction of database system which integrates the genetic information of oral microbial. As a result, it compares the degree of genetic similarity with the species belonging to the database using the destructive virulence factors as genetic marker. The search system with the database, named as PPVF is accessible on the internet through the web site <http://labb.snu.ac.kr/ppvf/>. Among the results it should be noted that 13 species of oral microorganisms have been found as potential pathogens of periodontal disease. These are consisted of estimated periodontal pathogen in other studies and normal oral microflora of health population. Their own pathogenecity is very low but they are opportunistic pathogens. When the balance of the normal flora is broken in the mouth and abnormal host immune system occurs, their pathogenecity will become very strong. The results of this study revealed some potential periodontal pathogens among species, whose relevance with periodontal disease was previously remained uncertain. And this will provide basic information for accurate diagnosis and identification of causal relationships about periodontal disease. It is hoped that this research will be further developed for the practical use.

.....

keywords : periodontal disease, periodontal pathogen, bioinformatics, public health

Student Number : 2012-21892